

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-512852

(P2003-512852A)

(43) 公表日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
67/033	5 0 1	67/033	5 0 1 4 B 0 5 0
	5 0 2		5 0 2 4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 9/50	
9/50		15/00	Z N A A
		審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 86 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-534334(P2001-534334)
 (86) (22) 出願日 平成12年11月6日(2000.11.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年5月7日(2002.5.7)
 (86) 国際出願番号 P C T / S E 0 0 / 0 2 1 6 8
 (87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 3 2 1 2 6
 (87) 国際公開日 平成13年5月10日(2001.5.10)
 (31) 優先権主張番号 0 9 / 4 3 4, 0 6 6
 (32) 優先日 平成11年11月5日(1999.11.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 アレキス アーペー
 スウェーデン, エス-431 37 メール
 ンダール, クロックスレーツ ファブリ
 ケール 30
 (72) 発明者 リュシュマーン, エル. ホールゲル
 スウェーデン, エス-168 39 ブルン
 マ, ファーゲルヴィクスヴァーゲン 3
 (72) 発明者 ガリ, エル. ゲー, ヨアキン
 スウェーデン, エス-187 70 タービ
 ー, カプランヴァーゲン 11
 (74) 代理人 弁理士 安達 光雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インスリン非依存性糖尿病のコンジェニック動物モデル

(57) 【要約】

I I 型糖尿病関連表現型を有するコンジェニック動物および動物集団が記述される。I I 型糖尿病関連表現型と関連するアミノ酸置換を有するインスリン分解ポリペプチドも記述される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ドナー動物およびレシピエント動物の遺伝的物質を含む非ヒトコンジェニック動物であって、前記コンジェニック動物がⅠⅠ型糖尿病関連表現型を示し、前記コンジェニック動物のゲノムの約1未満のクロモソームが前記ドナー動物から由来し、前記ドナーからの前記遺伝的物質が前記コンジェニック動物での前記ⅠⅠ型糖尿病関連表現型の発現に必要である、非ヒトコンジェニック動物。

【請求項2】 前記コンジェニック動物がマーカー定義される、請求項1に記載の動物。

【請求項3】 約50 cM未満の前記コンジェニック動物ゲノムが、前記ドナーから由来する、請求項1に記載の動物。

【請求項4】 約20 cM未満の前記コンジェニック動物ゲノムが、前記ドナーから由来する、請求項1に記載の動物。

【請求項5】 約10 cM未満の前記コンジェニック動物ゲノムが、前記ドナーから由来する、請求項1に記載の動物。

【請求項6】 約5 cM未満の前記コンジェニック動物ゲノムが、前記ドナーから由来する、請求項1に記載の動物。

【請求項7】 前記ⅠⅠ型糖尿病表現型が、食後血糖の上昇、高血圧、グルコース不耐性、インスリン耐性、異常インスリン分泌、インスリン活性減少、体重増加、異脂肪血症、高インスリン血漿、脂質生成障害、グリコーゲン代謝変化、凝固アテローム性動脈硬化症変化、腎機能変化、神経機能変化、眼機能変化、肥満および炎症からなる群より選択される、請求項1に記載の動物。

【請求項8】 前記ドナー動物のゲノムが、N i d d m l a ゲノム区画を含む、請求項1に記載の動物。

【請求項9】 前記ドナー由来の前記コンジェニック動物のゲノムが、N i d d m l e ゲノム区画を含む、請求項1に記載の動物。

【請求項10】 前記ドナー由来の前記コンジェニック動物ゲノムが、N i d d m l a、N i d d m l b、N i d d m l c、N i d d m l d、N i d d m l e、N i d d m l f、N i d d m l g、N i d d m l hおよびN i d d m l iか

らなる群より選択したゲノム区画から選択される、請求項1に記載の動物。

【請求項11】 前記ドナー由来の前記コンジェニック動物のゲノムが、NiddmC2、NiddmC3、NiddmC5、NiddmC7、NiddmC9A、NiddmC9B、NiddmC10、NiddmC11、NiddmC13、NiddmC18、NiddmC(13+15)、およびNiddmC(9+13+15)からなる群より選択したゲノム区画から選択される、請求項1に記載の動物。

【請求項12】 前記コンジェニック動物の実質的にすべてのミトコンドリアが、前記レシピエント動物または前記ドナー動物のいずれかから由来する、請求項1に記載の動物。

【請求項13】 前記コンジェニック動物の実質的にすべてのミトコンドリアが、前記レシピエントから由来する、請求項1に記載の動物。

【請求項14】 請求項1に記載のコンジェニック動物の単離細胞。

【請求項15】 前記細胞が、脂肪細胞、血管間膜細胞、肝細胞、膵臓細胞、筋肉細胞、内皮細胞および神経細胞からなる群より選択される、請求項14に記載の細胞。

【請求項16】 請求項1に記載のコンジェニック動物から由来した組織培養物。

【請求項17】 前記培養物が、脂肪組織、血管間膜組織、肝臓組織、膵臓組織、筋肉組織、血管組織、および神経組織からなる群より選択される、請求項16に記載の組織培養物。

【請求項18】 前記コンジェニック動物が、非ヒト哺乳動物、昆虫および鳥類からなる群より選択される、請求項1に記載のコンジェニック動物。

【請求項19】 前記非ヒト哺乳動物が、齧歯類動物またはブタである、請求項1に記載のコンジェニック動物。

【請求項20】 前記齧歯類動物がラット、マウスまたはモルモットである、請求項19に記載のコンジェニック動物。

【請求項21】 前記齧歯類動物がラットである、請求項20に記載のコンジェニック動物。

【請求項 2 2】 複数の非ヒトコンジェニック動物を含む非ヒトコンジェニック動物集団であって、前記コンジェニック動物が複数の I I 型糖尿病関連表現型を示し、前記複数のコンジェニック動物内の各コンジェニック動物はドナー動物およびレシピエント動物からの遺伝的物質を含み、約 0. 1 %～約 5 0 %の各コンジェニック動物のゲノムは前記ドナー動物から由来し、前記ドナー動物由来の前記遺伝的物質が各前記コンジェニック動物での前記 I I 型糖尿病関連表現型の発現に必要である、非ヒトコンジェニック動物集団。

【請求項 2 3】 薬理的に活性化化合物を試験する方法であって、

a) 試験化合物を、I I 型糖尿病関連表現型を示す非ヒトコンジェニック動物に投与する工程であって、前記非ヒトコンジェニック動物がドナー動物およびレシピエント動物の遺伝的物質を含み、約 5 0 c M未満の前記コンジェニック動物のゲノムが前記ドナー動物から由来し、前記ドナー由来の前記遺伝的物質が前記コンジェニック動物での I I 型糖尿病関連表現型の発現に必要である工程と、

b) 前記試験化合物を、前記コンジェニック動物での少なくとも 1 つの I I 型糖尿病関連表現型における効果に関して評価する工程とを含む方法。

【請求項 2 4】 前記コンジェニック動物が、N i d d m 1 a 遺伝的区画を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】 前記コンジェニック動物が、N i d d m 1 e 遺伝的区画を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】 前記コンジェニック動物が、N i d d m 1 a、N i d d m 1 b、N i d d m 1 c、N i d d m 1 d、N i d d m 1 e、N i d d m 1 f、N i d d m 1 g、N i d d m 1 h および N i d d m 1 i からなる群より選択された N i d d m 1 遺伝的区画を含む、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 7】 前記動物が 2 匹のコンジェニック親動物間の交配の子孫動物を含み、前記親動物が異なるコンジェニック区画を有する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 8】 薬理的に活性化化合物を試験するための方法であって、

a) 試験化合物を、複数の I I 型糖尿病関連表現型を示す複数の非ヒトコンジ

ェニック動物群に投与する工程と、

b) 少なくとも1つのI I型糖尿病関連表現型における効果に関して前記試験化合物を評価する工程であって、前記複数のコンジェニック動物内の各コンジェニック動物がドナー動物およびレシピエント動物からの遺伝的物質を含み、各コンジェニック動物のゲノムの約0.1%~約50%が前記ドナー動物から由来し、前記ドナーからの前記遺伝的物質が各前記コンジェニック動物での前記I I型糖尿病関連表現型の発現に必要である工程とを含む方法。

【請求項29】 前記複数のコンジェニック動物が、異なるクロモソーム上のコンジェニック区画を有する少なくとも2匹のラットを含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】 I I型糖尿病関連表現型を示す非ヒトコンジェニック動物の単離細胞を含む製造物品。

【請求項31】 前記物品が、前記細胞がI I型糖尿病関連表現型を軽減するのに効果的である可能性のある化合物を評価するために有用であることを示しているラベルまたはパッケージ貼付文章をさらに含む、請求項30に記載の物品。

【請求項32】 ビジネスを行う方法であって、

a) I I型糖尿病関連表現型を示している非ヒトコンジェニック動物、またはそれから由来した細胞の販売を申し出る工程と、

b) 前記動物が、I I型糖尿病関連表現型を軽減するために効果的である化合物を試験しまたは評価するために効果的であることを伝達する工程とを含む方法。

【請求項33】 非ヒトコンジェニック動物を作製する方法であって、

a) ドナー動物とレシピエント動物を交配し、子孫動物を産出する工程と、

b) 少なくとも10世代、前記子孫動物を前記レシピエント動物と首尾よく戻し交配し、前記コンジェニック動物を産出する工程であって、前記コンジェニック動物がI I型糖尿病関連表現型を示し、約50cM未満の前記コンジェニック動物のゲノムが前記ドナー動物から由来し、前記ドナーの前記遺伝的物質が前記

コンジェニック動物での前記 I I 型糖尿病関連表現型の発現に必要である工程とを含む方法。

【請求項 3 4】 単離されたインスリン分解ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換が I I 型糖尿病関連表現型と関連する、ポリペプチド。

【請求項 3 5】 前記ポリペプチドが、SEQ ID NO : 2 3 のアミノ酸配列中、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む、請求項 3 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 6】 SEQ ID NO : 2 3 のアミノ酸 1 8 でアルギニン残基が置換されている、請求項 3 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 7】 SEQ ID NO : 2 3 のアミノ酸 8 9 0 でバリン残基が置換されている、請求項 3 5 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 8】 前記ポリペプチドが、SEQ ID NO : 2 3 のアミノ酸 1 8 およびアミノ酸 8 9 0 での置換を含む、請求項 3 5 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 9】 インスリン分解ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドであって、前記ポリペプチドがアミノ酸置換を含み、前記アミノ酸置換が I I 型糖尿病関連表現型に関連している、ポリヌクレオチド。

【請求項 4 0】 SEQ ID NO : 2 3 のアミノ酸 1 8 でアルギニン残基が置換されている、請求項 3 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 1】 SEQ ID NO : 2 3 のアミノ酸 8 9 0 でバリン残基が置換されている、請求項 3 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 2】 前記ポリヌクレオチドが、SEQ ID NO : 2 2 のヌクレオチド 2 8 1 7 にシトシン残基を有する、請求項 3 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 3】 ゲノムがインスリン分解ポリペプチドトランス遺伝子を含むトランスジェニック非ヒト動物であって、前記トランス遺伝子が、インスリン分解ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに作用可能に連結された調節ポリヌクレオチドを含み、前記インスリン分解ポリペプチドが I I 型糖尿病関

連表現型に関連したアミノ酸置換を有する、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 4 4】 前記動物が、ラットである、請求項 4 3 に記載の動物。

【請求項 4 5】 前記動物が、マウスである、請求項 4 3 に記載の動物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、I I型糖尿病関連表現型を示す非ヒトコンジェニック動物およびコンジェニック動物集団、ならびにI I型糖尿病関連表現型を与える置換を含むインスリン分解ポリペプチドに関する。

【0002】

発明の背景

I I型糖尿病またはインスリン非依存性糖尿病（N I D D M）は、年老いた生理学的不活性の太りすぎの個人に関連するため、老年人口を持つ都市化社会で増加している健康負担である。全世界でおよそ1億3500万人の人々が影響を受けており、したがって、心筋梗塞、発作、末期腎疾患、色覚異常、および神経疾患に対するリスクを増加させる。

【0003】

一般的に、本疾患は、標的組織でのインスリン活性の減損、および膵臓 β 細胞からのインスリンの分泌能力の減少の結果であるとされている。多くの家族および双子試験によって、環境因子の重大な影響ならびにI I型糖尿病に対するリスクに関する遺伝的因子の相当な影響が示された。遺伝の常染色体優性モード（M O D Y）を伴う糖尿病の一遺伝子性変異体または糖尿病のミトコンドリア遺伝が、分子および臨床レベルにおいて最近記述されている。しかしながら、本疾患の一般的な型は、多遺伝子性および環境要因の両方の影響を伴った多くの要因からなるように見える。

【0004】

発明の概要

本発明は、I I型糖尿病関連表現型を有する、コンジェニック動物およびコンジェニック動物集団の発展に基づくものである。コンジェニック動物種の発展により、定量的形質座（Q T L）内で増加している感受性遺伝子を同定すること、ならびにそのような遺伝子の病理生理学的関連を特徴付けすることが可能である。本発明のコンジェニック動物はI I型糖尿病関連表現型を有するため、本明細

書に記載のインスリン分解酵素の変異体のような、関連遺伝子が位置的にクローニングできるように、遺伝子微細マッピングもまた実施することができる。さらに、コンジェニック種およびヘテロ接合戻し交配動物の生理学的特徴付けは、複合表現型の病理生理に対する単一Q L Tの寄与に関する道標を提供する。本発明のN i d d m 1 コンジェニック種は、本疾患の病理生理学的機構を明らかにしうる、穏やかなI I 型糖尿病に関する特定の動物モデルを提供し、薬理学的薬剤をスクリーニングするツールを提供する。

【0005】

一方の側面において、本発明は、ドナー動物およびレシピエント動物の遺伝的物質を含む非ヒトコンジェニック動物を特徴とする。コンジェニック動物はI I 型糖尿病関連表現型を示し、コンジェニック動物ゲノムの約1未満のクロモソーム（例えば約50 cM未満、20 cM未満、10 cM未満、または5 cM未満）がドナー動物から由来し、ドナーからの遺伝物質が、コンジェニック動物中でのI I 型糖尿病関連表現型の発現に必要である。コンジェニック動物は、マーカーで定義できる。コンジェニック動物の実質的にすべてのミトコンドリアは、レシピエント動物またはドナー動物いずれかから由来する。I I 型糖尿病関連表現型は、食後血糖の増加、高血圧、グルコース不耐性、インスリン耐性、異常インスリン分泌、インスリン活性減少、体重減少、異脂肪血症、高インスリン血漿、脂質生成障害、グリコーゲン代謝変化、凝固アテローム性動脈硬化症変化、腎機能変化、神経機能変化、眼機能変化、肥満および炎症からなる群より選択できる。

【0006】

ドナー動物のゲノムは、N i d d m 1 a ゲノム区画を含むことができる。ドナー由来のコンジェニック動物ゲノムはN i d d m 1 a、N i d d m 1 b、N i d d m 1 c、N i d d m 1 d、N i d d m 1 e、N i d d m 1 f、N i d d m 1 g、N i d d m 1 h、およびN i d d m 1 i からなる群より選択したゲノム区画を含むことができる。例えば、ゲノム区画は、N i d d m 1 e ゲノム区画であり得る。また、ドナー由来のコンジェニック動物ゲノムはN i d d m C 2、N i d d m C 3、N i d d m C 5、N i d d m C 7、N i d d m C 9 A、N i d d m C 9 B、N i d d m C 10、N i d d m C 11、N i d d m C 13、N i d d m C 1

8、NiddmC (13+15) およびNiddmC (9+13+15) からなる群より選別したゲノム区画より選別可能である。

【0007】

また、本発明は本発明のコンジェニック動物の単離細胞、ならびに本発明のコンジェニック動物由来の細胞培養物を特徴とする。細胞は、脂肪細胞、メサンギウム細胞、肝細胞、膵臓細胞、筋肉細胞、内皮細胞および神経細胞からなる群より選択できる。組織培養物は、脂肪組織、メサンギウム組織、肝臓組織、膵臓組織、筋肉組織、血管組織および神経組織からなる群より選択可能である。

【0008】

本発明のコンジェニック動物は、非ヒト哺乳動物（例えばラット、マウスまたはモルモット等の齧歯類、またはブタ）、昆虫または鳥類であり得る。齧歯類はラットであり得る。

【0009】

また、本発明は、第1の非ヒトコンジェニック動物を第2の非ヒトコンジェニック動物と交配させることによって入手した非ヒトコンジェニック動物を特徴とし、第1および第2のコンジェニック動物は、I I型糖尿病関連表現型を有する。第1および第2のコンジェニック動物は、異なる代謝表現型を有することが可能であり、かつ／または重なり合っていないゲノム区画を有することが可能である。そのようなコンジェニック動物は、重なり合っていないゲノム区画間の上位性相互作用を評価するのに効果的である。

【0010】

他方の側面において、本発明は、多数の非ヒトコンジェニック動物を含む非ヒトコンジェニック動物集団を特徴とする。コンジェニック動物は、多くのI I型糖尿病表現型を示し、多数のコンジェニック動物内のそれぞれのコンジェニック動物には、ドナー動物およびレシピエント動物からの遺伝的物質が含まれ、約0.1%～約50%の各コンジェニック動物ゲノムがドナー動物から由来し、ドナーからの遺伝物質は、それぞれのコンジェニック動物内のI I型糖尿病関連表現型の発現に必要である。

【0011】

また、本発明は、薬理学的に活性な化合物を試験するための方法の特徴とする。本方法には、試験化合物を、I I型糖尿病関連表現型を示す非ヒトコンジェニック動物に投与する工程であって、該非ヒトコンジェニック動物には、ドナー動物およびレシピエント動物の遺伝的物質が含まれ、約50cM未満のコンジェニック動物ゲノムがドナー動物由来であり、ドナーからの遺伝的物質がコンジェニック動物でのI I型糖尿病関連表現型の発現に必要である工程、およびコンジェニック動物での少なくとも1つのI I型糖尿病関連表現型における効果に関して試験化合物を評価する工程が含まれる。コンジェニック動物は、上述したような遺伝的区画を含むことが可能である。動物は、2匹のコンジェニック親動物間で交配した子孫動物を含むことが可能であり、親動物は異なるコンジェニック区画を有する。

【0012】

他方の側面において、本発明は、薬理学的に活性な化合物を試験するための方法の特徴とする。本方法は、試験化合物を、複数のI I型糖尿病関連表現型を示している複数の非ヒトコンジェニック動物に投与する工程、および少なくとも1つのI I型糖尿病関連表現型上での効果に関して試験化合物を評価する工程を含み、多数のコンジェニック動物内でのそれぞれのコンジェニック動物は、ドナー動物およびレシピエント動物からの遺伝的物質を含み、約0.1%～約50%の各コンジェニック動物ゲノムがドナー動物から由来し、ドナーからの遺伝的物質は、それぞれのコンジェニック動物でのI I型糖尿病関連表現型の発現に必要である。多数のコンジェニック動物には、異なるクロモソーム上のコンジェニック区画を持っている少なくとも2匹のラットが含まれ得る。

【0013】

また、本発明は、I I型糖尿病関連表現型を示している非ヒトコンジェニック動物の単離細胞を含む製造物品の特徴とする。本物品はさらに、細胞が、I I型糖尿病関連表現型を軽減するのに効果的であり得る化合物を評価するために効果的であることを示唆しているラベルまたはパッケージ貼付文章を含むことが可能である。

【0014】

他方の側面において、本発明は、ビジネスを行う方法の特徴とする。本方法には、I I 型糖尿病関連表現型を示している非ヒトコンジュニック動物、またはそれらから由来した細胞の販売を申し出る工程、および動物が、I I 型糖尿病関連表現型を軽減するのに効果的である化合物を、試験または評価するために効果的であることを伝達する工程が含まれる。

【0015】

さらに他方の側面において、本発明は、ドナー動物とレシピエント動物を交配し、子孫動物を産出する工程、および首尾よく前記子孫動物を少なくとも10世代、レシピエント動物と戻し交配し、コンジュニック動物を産出する工程を含む非ヒトコンジュニック動物を作製する方法の特徴とし、該コンジュニック動物はI I 型糖尿病関連表現型を示し、約50cM未満のコンジュニック動物ゲノムがドナー動物から由来し、ドナーの遺伝的物質が、コンジュニック動物でのI I 型糖尿病関連表現型の発現に必要である。

【0016】

また、本発明は、単離されたインスリン分解ポリペプチドおよびインスリン分解ポリペプチドをコードしている単離したポリヌクレオチドの特徴とし、該ポリペプチドは、少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、該アミノ酸置換は、I I 型糖尿病関連表現型に関連している。ポリペプチドには、SEQ ID NO: 23のアミノ酸配列中の少なくとも1つのアミノ酸置換、例えばSEQ ID NO: 23のアミノ酸18で置換されたアルギニン残基および／またはアミノ酸890で置換されたバリン残基を含むことが可能である。ポリヌクレオチドは、SEQ ID NO: 22のヌクレオチド2817にシトシン残基を有することが可能である。

【0017】

また、本発明は、ゲノムに、インスリン分解ポリペプチドトランス遺伝子が含まれる、トランスジェニック非ヒト動物の特徴とし、トランス遺伝子には、インスリン分解ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに作用可能に連結された調節ポリヌクレオチドが含まれ、インスリン分解ポリペプチドは、I I 型糖尿病関連表現型に関連したアミノ酸置換を有する。動物はラットまたはマウスで

あり得る。

【0018】

他の定義しない限り、本明細書で使用したすべての技術的および科学的用語は、本発明の属する技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同様の意味を持つ。本明細書で記述したものと同様または等価の方法および物質を本発明の実施に使用できるけれども、好適な方法および物質は以下に記述している。すべての刊行物、特許明細書、特許および本明細書で言及した他の参考文献は、そのすべてが参考文献として組み込まれている。論争になる場合、定義を含む本明細書が制御するであろう。さらに、物質、方法および実施例は例示的であるのみであり、限定することを意図していない。

【0019】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明より、かつ請求項より明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、コンジェニック種Niddm1a、Niddm1b、およびNiddm1iでのラットクロモソーム1の遠位部分の遺伝子マップである。Goto-Kakizaki (GK) 由来ゲノム区画の内容を、3つのコンジェニック種に関する黒棒として示している。白色は、最も近く隣接するマーカーによって定義されたように、GKとF344由来対立遺伝子間の交差点にまたがるゲノム区画を示している。

図2A～2Dは、Niddm1コンジェニックおよびF344ラットの腹膜内グルコース耐性試験を図示したグラフである。種Niddm1a (n=11)、Niddm1b (n=17)、Niddm1i (n=12) およびF344 (n=20) からのオスラット (95日齢) をIPGTTにかけた。グルコース注入後、血中グルコース (2A、2B)、および血清インスリン (2C、2D) の濃度を、示した時間点にて測定した。結果は平均±semとして示している。

図3A～3Dは、F344、GK、Niddm1b、およびNiddm1iラットでのインスリンによって刺激される合成の結果として、脂質内へのグルコースの取り込みを図示したグラフである。脂肪細胞を、2ヶ月齢オスF344 (n

=7)、GK (n=4)、Niddm1b (n=5)、およびNiddm1i (n=5) ラットの精巣上体脂肪より単離し、インスリン (0~20, 000 μ U/ml) と共に2時間インキュベートした。図3Aは、インスリンのない状態 (基礎条件) での、脂質内へのグルコース取り込み (脂質生成) が、GK (p=0.009)、Niddm1b (p=0.007)、およびNiddm1i (p=0.04) ラットよりも、F344ラットで高いことを示している。図3Bは、最大インスリン誘導脂質生成が、GK (p=0.00004)、Niddm1b (p=0.008)、およびNiddm1i (p=0.001) ラットよりも、F344ラットで高いことを示している。最大インスリン誘導脂質生成は、GK (p=0.02および0.006) に比べてNiddm1bおよびNiddm1i ラットでより高かった。図3Cおよび3Dは、インスリンなし (3C) または最大量の存在下 (3D) で得られた、上記値の増加 (平均 \pm sem) として示した、用量依存的インスリン刺激脂質生成を示している。

図4は、GK、F344およびNiddm1ラットでのインスリンRNAの定量的解析を示したグラフである。結果は平均 \pm semで示している。RNAの量は、ピクセルとして示しており、リン光体イメージング技術を用いてバンド強度より計算した。

図5は、コンジェニックラット種Niddm1b、Niddm1c、Niddm1fおよびNiddm1eラットでの、ラットクロモソーム1の部分の遺伝的マップである。GK由来ゲノム区画の範囲を、4つのコンジェニック種に関して黒棒で示している。白棒は、最も近くに隣接しているマーカーによって定義されたような、GKおよびF344由来対立遺伝子間の交差点にまたがるゲノム区画を示している。

図6A~6Bは、精巣上体脂肪から単離した脂肪細胞における脂質生成を図示したグラフである。脂肪細胞を、2ヶ月齢オスF344 (n=6)、Niddm1f (n=5) およびNiddm1e (n=4) ラットより単離し、インスリン (0~20, 000 TU/ml) と共に2時間インキュベートした。図6Aは、インスリンのない状態 (基礎条件) での、脂質生成が、Niddm1f (p=0.001)、およびNiddm1e (p=0.002) ラットよりも、F344

ラットで高いことを示している。図6Bは、最大インスリン誘導脂質生成が、Niddm1f ($p=0.00001$)、およびNiddm1e ($p=0.003$) ラットよりも、F344ラットで高いことを示している。

図7は、ラットインスリン分解酵素 (IDE) をコードしている遺伝子の翻訳部分の概略図である。

図8は、もともとのCOS-1細胞内での、野生型IDEおよびIDE変異体A890V (すなわち、アミノ酸890の位置でアラニンの代わりにバリンであるもの)、H18R (すなわち、アミノ酸18の位置でヒスチジンの代わりにアルギニンであるもの)、およびA890V+H18Rのインスリン分解活性を図示しているグラフである。すべての値は、4つの異なるトランスフェクションからのものであり、任意で100%と定義した、野生型活性 (F344ラットからのpCMV4-Idcをトランスフェクトした細胞) のパーセンテージとして表している。各実験内で、バックグラウンドCOS-1インスリン分解活性を、各個々の値より差し引き、活性は、総タンパク含量および β -ガラクトシダーゼ活性両方に関して補正した。A890V、H18RおよびA890R+H18Rの実際の値 (平均 \pm sem) は、それぞれ95 \pm 9、89 \pm 8および69 \pm 6%である。

【0020】

詳細説明

II型糖尿病のコンジェニック動物モデル

本発明は、ドナーおよびレシピエント動物を交配した後に同定される非ヒトコンジェニック動物、およびそのようなコンジェニック動物由来の細胞および組織を特徴とする。一般的に、コンジェニック動物は、第二動物種 (すなわちレシピエント) の遺伝的背景との関連で、1匹の動物種 (すなわちドナー) からの遺伝的物質 (遺伝的区画) の分離部分を含む。同系交配しうる非ヒト動物が、ドナーおよびレシピエント動物としての使用に好適である。非限定例として、マウス、ラットのような齧歯類、ウサギ、およびモルモット、ブタ、ウシ、ヒツジ、魚類、および七面鳥およびニワトリのような鳥類が含まれる。ラット、マウスおよびブタがとりわけ有用な動物である。典型的に、「ドナー (donor)」は、遺

伝的に連結したⅠⅠ型糖尿病関連表現型を持つ動物を意味する。ドナー動物は、例えばGKラット、Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット、NZOマウス、およびNONマウスでありうる。例えばKim et al., Physiol. Pharmacol., 1998, 9 (2-4) : 325-345を参照のこと。

【0021】

GKラットは、ⅠⅠ型糖尿病に関して広範囲に研究された動物モデルである。GK動物の表現型はよく特徴化されており、断食高血糖、グルコースへの応答におけるインスリン分泌障害、インスリン耐性、ならびに遅延合併症、例えばニューロパシーおよびネフロパシーのようなⅠⅠ型糖尿病に典型的な種々の特徴を含む。GKと、血糖値正常のF344ラット間のF2交雑の遺伝的連結解析は、ゲノム幅重要性を伴う4つの主要なQTL (Niddm1、Niddm2、Niddm3およびweight1)、ならびに糖尿病の分離とその関連する表現型に影響を与える10の副次的なQTLを同定した。Galli, J. et al., Nature Genet., 1996, 12 : 31-37。OLETFラットは、緩やかな肥満を示しており、加齢とともに、性二相性NIDDMが発達する。OLETFとBNまたはFラット間のF₂交雑の解析によって、QTLとしてDm_oIが、グルコース不耐、断食血漿グルコース濃度、および体重に関連し、ラットクロモソーム1のNiddm1領域でみられることが同定されている。上記Kim et al., 1998。典型的には、「レシピエント (recipient)」は、ⅠⅠ型糖尿病関連表現型を示していない同系交配動物を指す。レシピエント動物は、例えば、Fischer-344、DA、LEW、ACI、WKY、SDまたはBNラット、またはBALB/c、FVBまたはSSLマウスであり得る。

【0022】

一般的に、ドナー動物は、ⅠⅠ型糖尿病関連表現型を示し、一方でレシピエント動物は示さない。そのような動物の交配によって、ⅠⅠ型糖尿病関連対立遺伝子を、ⅠⅠ型糖尿病関連表現型に関連して遺伝子移入させることが可能である。あるいは、レシピエント動物がⅠⅠ型糖尿病関連表現型を示し、ドナー動物が示

さない。そのような動物の交配によって、I I 型糖尿病関連対立遺伝子を、I I 型糖尿病関連表現型に関連して遺伝子移入させることが可能である。

【0023】

ドナーとレシピエントの交配の後、子孫をレシピエント動物と首尾よく戻し交配し、当該対立遺伝子をレシピエントのゲノム上に移入して、コンジェニック動物を産出する。典型的に、コンジェニック動物は、少なくともF10世代より同定される。あるいは、「スピード コンジェニクス (speed congenics)」または「マーカ―補助交配 (marker-assisted breeding)」として参照される手順を用いることができる。例えば、Whittaker et al., Genet. Res., 66 (3): 255-265, 1995、およびDarvasi, Nat. Genet., 18 (1): 19-24, 1998を参照のこと。この方法では、各戻し交配世代の子孫を、最大数のドナーバックグラウンド対立遺伝子を欠失しているように選択する。コンジェニック動物がF10世代より早く（例えばF9世代）同定可能であるように、本方法ではより少ない交配しか必要とされない。子孫の表現型は、例えば、腹膜内、または静脈内グルコース耐性試験（血清グルコースおよびインスリン濃度を、グルコースを注入した断食動物で測定するもの）によって各世代で評価可能である。さらに、グルコース濃度をインスリンの注入の後に動物において測定するインスリン耐性試験、または栄養素またはホルモン濃度を断食、および/または誘発に続いて測定する試験を動物の表現型決定のために使用できる。ミトコンドリアは母系遺伝するので、本質的にコンジェニック動物のすべてのミトコンドリアは、ドナーまたはレシピエントいずれか由来であり得る。

【0024】

公知の遺伝マーカ―を用いて、本発明のコンジェニック動物において、遺伝子型を評価できる。例えば、タンデムアレイ中で複数回繰り返される一、二、三または四量体配列からなるマイクロサテライト、または単純配列長多型 (SSLP) の存在を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて、マイクロサテライトまたはSSLPの周辺の領域を増幅することで評価することができる。いくつかの実施形態において、本発明のコンジェニック動物を、「マーカ―定義 (

marker-defined)」として特徴付けしてよく、これは、上述したように遺伝子型を決定した時に、動物が遺伝的に純粋であることを示している。したがって、ドナー動物がGKラットである場合、マーカー定義コンジェニック動物は、GK特異的領域をのぞいて、レシピエント動物からのすべてのマーカーを有しており、典型的には長さにして1クロモソーム未満である。

【0025】

したがって、食後のグルコース濃度においてほぼ30%の遺伝的効果を示している、Niddm1のような主要なQTLを、QTLの異なる部分をカバーするコンジェニック種を確立することによって異なった遺伝的因子内に分類することができる。例えば、コンジェニック種は、Niddm1-GK体質遺伝子を、血糖正常F344ラットのゲノム上に移入することによって確立することができる。領域は、長さにして例えば約50センチモルガン(cM)、20cM、10cMまたは5cM未満であり得る。本明細書で記述したように、Niddm1a、Niddm1b、Niddm1i、Niddm1e、Niddm1d、Niddm1f、Niddm1gおよびNiddm1hコンジェニック種は、GKのゲノム由来で、それぞれ約52、28、22、3、19、8、13および24cMを含む。Niddm1座は、重なり合っていないコンジェニック種Niddm1bとNiddm1iによって定義された2つの遺伝子実体に分かれ、各遺伝子実体は糖尿病表現型において異なった効果を有する。本発明のコンジェニック動物は、以下の、食後高血糖の上昇、高血圧、グルコース不耐、インスリン耐性、インスリン分泌変化、インスリン活性減少、体重増加、脂質生成障害、グリコーゲン代謝変化、凝固アテローム性動脈硬化症変化、腎機能変化（例えばネフロパシー）、眼機能変化（例えば網膜症）、神経機能変化（例えばニューロパシー）、および太大血管障害または細小血管障害の1つまたはそれ以上を含むII型糖尿病関連表現型を示している。例えば、コンジェニック種Niddm1bおよびNiddm1iはそれぞれ、食後グルコース濃度の増加およびin vitroでの単離した脂肪細胞中の基礎およびインスリン誘導脂質生成を示した。しかしながらいくつかの特徴はそれぞれの種に対して固有である。Niddm1iラットは、in vivoで、インスリン分泌の重度の減少との組合せでインスリン耐性

を示す。Niddm1 QTLの本亜種は、体重の増加、精巢上体脂肪量の増加、またはトリグリセリドのレベルの増加を発生させなかった。したがって、表現型は、インスリン分泌における早期欠失を伴うMODYの患者のものと同一である。しかしながら、インスリン分泌欠失がNiddm1i/F344ヘテロ接合体ラットで観察されなかったので、遺伝の形式は、明らかに劣性形質である。IPGTT間のインスリン濃度は、若年Niddm1iラットでは減少し、一方で食後グルコース濃度はF344でよりもわずかに高く、このことはおそらく、この年齢でのインスリン非依存性グルコース処理の重要な寄与を示している。

【0026】

GKラットと同様に、糖尿病患者において、インスリン分泌とインスリン活性両方の欠失が、疾患の発展に密接に関わっている。これらの欠失の関連病因重要性はまだ論争的である。65日齢Niddm1iラットにおいては、食後グルコース濃度がわずかに上昇するにすぎず、基底グルコースが通常であるので、インスリン分泌および活性における欠失は、単なるグルコ毒性の結果ではないとみられる。特定の機構によって基づくことなく、Niddm1iは、膵臓β細胞中でのインスリン分泌および脂肪細胞でのインシュリン活性に共通の機構を減じた可能性がある。インスリンレセプター基質2、IRS-2をコードしている遺伝子と同様に、マウスにおけるインスリン分泌および活性両方で欠失を引き起こす。Withers, D. J. et. al., *Nature*, 1998, 391: 900-904。Irs-2遺伝子はヒトにおいてクロモソーム13に、そしてマウスにおいてクロモソーム8に局在している。シンテニー保存に従って、Irs-2遺伝子はNiddm1i表現型に関する候補遺伝子ではない。

【0027】

若年Niddm1bおよびヘテロ接合体Niddm1b/F344ラットは、わずかに食後グルコース濃度が上昇したが、本質的にインスリン濃度が上昇し、このことは、インスリン耐性が、インスリン分泌の増加によって代償されていることを示唆している。高齢ヘテロ接合体ラットにおいては、インスリン活性の欠失がまだ代償されているが、絶食高血糖、絶食高インスリン血症、体重および精巢上体脂肪量の増加、ならびに脂質生成障害が起こっているホモ接合体Nidd

m1bラットでは代償されていない。この座は、インスリン耐性が、代謝症候群での基礎として考えられている、糖尿病患者においてよく認識されている。Niddm1bラットでのインスリン耐性が、主な欠失である可能性があることは、Niddm1b/F344ヘテロ接合体ラットでもインスリン耐性の兆候が示されているが、他の糖尿病関連表現型のレベルは、通常かまたは通常より低く示されているという事実より支持されている。

【0028】

ヒトにおけるインスリン耐性および糖尿病が、しばしば高トリグリセリド血漿、LDLコレステロール濃度の増加、およびHDLコレステロール濃度減少に関連する。Niddm1bラットは、総コレステロールおよびHDLコレステロールの増加とともに、トリグリセリド濃度の増加を示している。総コレステロールとHDLコレステロール間の差は、LDLとVLDLコレステロール濃度をほぼ反映しているに違いなく、Niddm1bとF344ラット間で差は観察されなかった。したがって、Niddm1bでの脂質代謝の障害は、糖尿病患者でのパターンに正確に適用していない。この矛盾はおそらく、ヒトと比較して、齧歯類の脂質生成障害の顕在化における種特異的差を反映している。

【0029】

本明細書で説明するデータは、2つの糖尿病座Niddm1bとNiddm1i間の非対立遺伝子相互作用または上位性の存在を示唆している。F344ラットと比較して、(Niddm1bおよびNiddm1i両方を含む)Niddm1aにおいて、食後グルコース濃度の増加が、2つの亜種の追加的効果より予想され得るものよりも重度ではない。生理学的用語における上位性の解釈は、動物が(GKのように)さらなる糖尿病遺伝子を含んでいるか、環境ストレスを受けていない限り、過剰なグルコース濃度に対して器官を保護する逆調節機構が、高血糖症を制限していることを示唆している。

【0030】

ヒトにおけるNiddm1aに相当する相同的クロモソーム領域は、11q13、9p24、および10q24~26である。興味深いことに、メキシコ人—アメリカ人集団での糖尿病に関連した座が、最近クロモソーム10q上で報告さ

れた。本発明者らはまた、N i d d m 1 b に相当する、ヒトクロモソーム9 p 上で、糖尿病への関連を示唆する座を報告した。

【0031】

本発明のさらなるコンジェニック動物を、第1コンジェニック動物を、1匹またはそれ以上の第2のコンジェニック動物と交配することによって産出してよい。第1および第2のコンジェニック動物は、各々上述したように、ドナーおよびレシピエント動物の交配の後、F10世代から得てよい。典型的には、第1および第2のコンジェニック動物は、ドナーから由来した重なり合っていないゲノム区画を有しており、典型的にはI I型糖尿病関連表現型を有する。そのような交配によって得たコンジェニック動物は、重なり合っていない区画間の上位性相互作用を評価するために効果的である。

【0032】

コンジェニック動物集団

本発明は、多数のI I型糖尿病関連表現型を示しているコンジェニック動物集団を特徴とする。コンジェニック動物集団は、上述したように、ドナーおよびレシピエント動物の交配より同定されるが、F3から少なくともF10世代（例えばF12世代）までの多数の動物を含む。そのような動物集団の中の各動物は、ドナー動物に由来したそのゲノムの約0.1%～約50%を有している。したがって、コンジェニック動物集団中の各動物は、ドナー動物から由来した異なる部分のゲノムを有し、それは、集団中の他のコンジェニック動物とは異なる。

【0033】

本発明のコンジェニック動物集団およびそれより由来する組織、細胞および細胞抽出物は、I I型糖尿病関連表現型の上位性効果を評価するのに効果的であり、I I型糖尿病を処置するために有用である可能性のある薬理学的剤を同定するのに使用できる。例えば、試験化合物を本発明のコンジェニック動物またはコンジェニック動物集団に添加し、食後高血糖の上昇、高血圧、グルコース不耐、インスリン耐性、インスリン分泌変化、インスリン活性減少、体重増加、脂肪血症異常、高インスリン欠血症、脂肪合成障害、およびグリコーゲン代謝変化のような糖尿病関連表現型を、対照動物と比較してモニタする。試験化合物を、薬理学

的に許容可能な非毒性賦形剤または担体と混合することによって、薬理学的組成物内に処方でき、任意の投与経路にて本発明のコンジュニク動物に投与できる。例えば、皮下、筋肉内、脈管内、皮内、鼻内、吸入、鞘内、または腹膜内投与のような非経口経路、および舌下、経口、または直腸投与のような腸経路を使用できる。

【0034】

インスリン分解ポリペプチド

本発明は、天然のポリペプチドと比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を含み、I I型糖尿病関連表現型に関連する、単離した、インスリン分解酵素（IDE）ポリペプチドを特徴とする。本明細書で使用するところの、語句「ポリペプチド（polypeptide）」は、長さまたは翻訳修飾に関係なく、任意のアミノ酸鎖である。アミノ酸は本明細書で、標準の3文字、および1文字略語で表される。IDE活性または発現に影響を与える薬剤（例えば小分子または生物学的巨大分子）を、標準の方法で同定できる。

【0035】

IDEは、高い特異性と低いKmにてインスリンと結合し、インスリンの細胞内処理および分解で重要な役割を演じる金属プロテアーゼである。IDEは、活性に Zn^{2+} が必要であるが、典型的な Zn^{2+} 結合部位は含んでおらず、HX XEH活性部位モチーフを含むプロテアーゼの新種に属することを示している。IDEタンパク質は進化的によく保存されており、このことは、そのインスリン除去機能に加えて、おそらく他のより複雑な細胞機能を有している。IDEは、細胞表面、エンドソーム、細胞質、およびペルオキシソームを含む種々の細胞内区画に局在化し、体内に広く発現している。インスリンはIDEに対するもっとも大きな親和性を持つ基質であり、このタンパク質は、IDEに結合するが、ほとんど分解されないプロインスリン、表皮増殖因子、およびインスリン様増殖因子-1（IGF-1）、およびIDEに結合し、簡単に分解されるIGF-1 I、心房性ナトリウム利尿因子、および形質転換増殖因子-1のような様々な他の増殖因子と相互作用する。研究ではまた、IDEが、細胞内タンパク質分解の主な場所であるプロテオソームと相互作用することが示されたので、他の型の細胞

内タンパク質分解におけるIDEの役割が明らかになった。ほかに、IDEが、グルココルチコイドおよびアンドロゲンレセプター両方と相互作用することが示されたので、IDEに関する機能は、ステロイド活性における調節の役割であることが明らかにされた。例えば、Authier et al., Clin. Invest. Med., 1996, 19(3):149-160を参照のこと。

【0036】

インスリン分解ポリペプチドの改変には、例えばSEQ ID NO:23のアミノ酸配列の残基18または890での少なくとも1つのアミノ酸置換が含まれる。置換は、保存的であっても、そうでなくてもよい。保存アミノ酸置換は、アミノ酸を同型のアミノ酸と置換し、一方で非保存アミノ酸置換はアミノ酸を他の型のアミノ酸と置換する。保存置換の例には、SEQ ID NO:23の残基18のヒスチジンに対するアルギニン(H18R)、および残基890でのアラニンに対するバリン(A890V)が含まれる。非保存置換は、結果としてポリペプチドの疎水性の本質的変化、または残基側鎖の大きさの変化となる。さらに、非保存置換は、電気陽性電荷の減少、または電気陰性電荷の導入のような、ポリペプチドの電荷の本質的変化を起こし得る。非保存置換の例には、非極性アミノ酸に対する塩基性アミノ酸、または酸性アミノ酸に対する極性アミノ酸が含まれる。

【0037】

本明細書で説明したように、Niddm1b座は、コンジュニク種Niddm1eによって定義されたほぼ3.7cMの小さな遺伝的領域にサブマップ化された。IDEをコードしている遺伝子はこの領域内にマップされ、IDEのGK特異的対立遺伝子変異体が同定された。GK対立遺伝子の翻訳された領域での2つのヌクレオチド変異体が、結果としてアミノ酸の変化、H18RおよびA890Vとなった。IDE cDNAが12の他のラット種で配列決定され、同定された変異体の頻度が調査された。A890Vは、GKに固有であるが、一方でH18Rは解析したラット種のおよそ50%で存在し、このことは、A890V変異体が、糖尿病表現型に関して重要である可能性を示唆している。さらに、in vitro発現解析により、両方の変化を含むGK変異体による、インスリン

分解の約30%の減少が示された。H18RおよびA890V変異体が、別々に研究され、A890Vに対しては明らかな効果は観察されず、H18Rは、インスリン分解能力のわずかな減少のみを示した。このことは、2つの変異体が、インスリン分解における効果を仲介するために、相乗的に作用していることを示している。GK変異体は、Ideトランスフェクト細胞の細胞溶解物中のインスリン分解に、なんの影響も持たないので、IDEにおける欠失は、インスリンのレセプター仲介内在化に特異的であり、共役し得る。50%までのインスリンが、培養した細胞の表面上で直接IDEによって分解されるので、Ide GK変異体の実際の効果は、まだすべて検出されていないことに注目すべきである。

【0038】

改変インスリン分解ポリペプチドをコードしている核酸

本発明の改変インスリン分解ポリペプチドをコードしている単離された核酸分子を、標準の技術によって産出できる。本明細書で使用するところの、「単離された(isolated)」は、改変インスリン分解ポリペプチドをコードしている遺伝子の部分またはすべてに相当する配列を意味し、ただし、通常哺乳動物ゲノム中の野生型遺伝子の1つまたは両方の側に隣接する配列を含まない。単離されたポリヌクレオチドは、例えば組換え体DNA分子であってよく、天然に存在するゲノム内の組換え体DNA分子が除去されたか、または存在しない直近で隣接していることが通常知られている核酸配列の1つまたは両方を提供する。したがって、単離されたポリヌクレオチドには、限定はしないが、他の配列から独立した分離分子(例えば、PCRまたは制限エンドヌクレアーゼ処理によって産出されたcDNAまたはゲノムDNA断片)として存在する組換え体DNA、ならびに、ベクター、自己複製プラスミド、ウイルス(例えばレトロウイルス、アデノウイルスまたはヘルペスウイルス)内、または真核細胞または原核細胞のゲノムDNA内に組み込まれた組換え体DNAが含まれる。さらに、単離されたポリヌクレオチドには、ハイブリッドの一部、または融合ポリヌクレオチドである組換え体DNA分子が含まれ得る。

【0039】

例えばcDNAまたはゲノムライブラリー、またはゲノムDNA制限消化を含

むゲルスライス内の他の数百～数百万のポリヌクレオチドの中に存在しているポリヌクレオチドが、単離されたポリヌクレオチドと見なされないことは、当業者に明らかであろう。

【0040】

単離されたポリヌクレオチドは、長さにして少なくとも約14ヌクレオチドであり、野生型からの配列内に置換を含む。例えば、核酸は、SEQ ID NO : 22のヌクレオチド68にグアニン、ヌクレオチド2684にチミン、またはヌクレオチド2817にシトシンを含む。核酸分子は、長さにして約14～20、20～50、50～100または150以上である。いくつかの実施形態において、単離された核酸分子は、全長、改変インスリン分解ポリペプチドをコードしている。核酸分子は、DNAまたはRNA、直線または環状、そしてセンスまたはアンチセンス方向であってよい。

【0041】

特定の点変化は、例えばオリゴヌクレオチド部位特異的変異導入によって、野生型インスリン分解ポリペプチドをコードしている核酸分子内に導入することができる。この方法において、望んだ変化をオリゴヌクレオチド内に導入し、ついで野生型核酸にハイブリッド形成させる。オリゴヌクレオチドを、DNAポリメラーゼにて伸長させ、導入した点変化の部分でミスマッチを含むヘテロ二本鎖、および5'末端での一本鎖ニックを作製し、これをDNAリガーゼにて密閉する。ミスマッチは、大腸菌(*E. coli*)の形質転換において修復され、改変インスリン分解ポリペプチドをコードしている遺伝子が大腸菌より再単離できる。部位特異的変異を導入するためのキットが商業的に購入できる。例えば、Mut a-Gene 7 in-vitro 変異導入キットが、バイオラッド ラボラトリー社(Bio-Rad Laboratories, Inc. : Hercules, CA)より購入できる。

【0042】

PCR技術もまた、変異を導入するために使用できる。例えば、Vallette et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17 : 723-733を参照のこと。PCRは、標的核酸を増幅する手順または技術

を言う。対象領域の末端から、またはそれを越えた配列情報を典型的に、増幅すべき鋳型の反対鎖に対する配列と同一であるオリゴヌクレオチドプライマーを設計するのに利用し、一方、変異導入のためには、望む変化を組み込むオリゴヌクレオチドを対象の核酸配列を増幅するために使用する。PCRは、全ゲノムDNAまたは全細胞RNAからの配列を含むDNAならびにRNAからの特定の配列を増幅するために使用できる。プライマーは典型的には、長さにして14～40ヌクレオチドであるが、長さにして10ヌクレオチド～数百ヌクレオチドの範囲であり得る。一般的なPCR技術は、例えばPCRプライマー：研究室マニュアル (PCR Primer: A Laboratory Manual), Dieffenbach, C. 及びDveksler, G. 編, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995に記載されている。

【0043】

改変インスリン分解ポリペプチドをコードしている核酸はまた、単一核酸分子として、または連続したオリゴヌクレオチドとしてのいずれかで、化学合成によって産出できる。例えば、長いオリゴヌクレオチド (例えば>100ヌクレオチド) の1つまたはそれ以上の対を、所望の配列を含んで合成でき、各対は、オリゴヌクレオチド対がアニールした時に二本鎖が形成されるように、相補性の短い区画 (例えば約15ヌクレオチド) を含んでいる。DNAポリメラーゼを使用してオリゴヌクレオチドを伸長させ、結果として、オリゴヌクレオチド対あたり1本の二本鎖核酸分子となり、ついでベクター内にライゲーション可能である。

【0044】

改変インスリン分解ポリペプチドの産出

本発明の改変インスリン分解ポリペプチドは、ポリペプチドをコードしている核酸分子を、発現ベクターのような核酸構造物内にライゲーションし、発現ベクターを細菌または真核宿主細胞に形質導入することで産出することができる。一般的に、核酸構造物には、インスリン分解ポリペプチドをコードしている核酸配列に作用可能に連結された調節配列が含まれる。調節配列は、典型的には遺伝子産物をコードしてはならず、代わりに、核酸配列の発現に影響を与える。本明細

書で使用するところの、「作用可能に連結された (operably linked)」は、核酸配列の転写および翻訳を促進する様式での、調節配列の核酸配列への連結を意味する。調節区画には、例えば、プロモーター配列、エンハンサー配列、応答区画、または誘導可能区画が含まれる。

【0045】

細菌系において、BL-21のような大腸菌 (*Escherichia coli*) 株が使用できる。好適な大腸菌ベクターには、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質を産出するベクターの pGEX シリーズが限定はしないが、含まれる。形質転換した大腸菌は典型的には指数関数的に増殖し、ついで、回収の前にイソプロピルチオガラクトピラノシド (IPTG) で刺激する。一般的に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースに吸着させ、遊離グルタチオンの存在下で溶出することで、溶解細胞より簡単に精製できる。pGEX ベクターは、クローン化した標的遺伝子産物が GST 部位から放出されるように、トロンビン、または第 Xa 因子プロテアーゼ開裂部位を含むように設計されている。

【0046】

真核宿主細胞において、多くのウイルスに基づく発現系が、改変インスリン分解ポリペプチドを発現するために利用できる。インスリン分解ポリペプチドをコードしている核酸を、例えば pBlueBac (インビトロジェン (Invitrogen, San Diego, CA) のようなバキュロウイルスベクター内にクローン化し、ついで、スポドプテラ フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 細胞に、オウトグラフィ カリフォルニカ (*Autographa californica*) 多重エンベロープ核多角体病ウイルス (AcMNPV) からの野生型 DNA とコトランスフェクトするのに使用する。改変インスリン分解ポリペプチドを産出している組換え体ウイルスは、標準の方法論にて同定できる。あるいは、インスリン分解ポリペプチドをコードしている核酸は、SV40、レトロウイルスまたはワクシニアに基づくウイルスベクター内に導入でき、宿主細胞を感染させるのに使用できる。

【0047】

安定に改変インスリン分解ポリペプチドを発現している哺乳動物細胞株を、適切な制御区画および選択可能マーカーを持つ発現ベクターを用いることで産出できる。例えば、真核細胞発現ベクター pCDNA3.1⁺ (インビトロジェン (Invitrogen, San Diego, CA) が、例えばCOS細胞、HEK293細胞、または胎児ハムスター腎臓細胞内での改変インスリン分解ポリペプチドの発現に好適である。エレクトロポレーション、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム、リポソーム仲介トランスフェクションまたは他の好適な方法による発現ベクターの導入の後、安定細胞株を選択できる。あるいは、一過性にトランスフェクトした細胞株を用いて、改変インスリン分解ポリペプチドを産出する。改変インスリン分解ポリペプチドはまた、小麦抽出物、またはウサギ角膜溶解物を用いて、*in vitro*で転写および翻訳可能である。

【0048】

改変インスリン分解ポリペプチドは、従来のクロマトグラフィー方法、または標準の技術を用いた化学合成によって精製できる。タンパク質合成技術の概説に関して、Muir, T. W. and Kent, S. B., Curr. Opin. Biotechnol., 1993, 4 (4) : 420-427を参照のこと。

【0049】

トランスジェニック非ヒト動物

本発明はまた、核酸構造物を含むトランスジェニック非ヒト哺乳動物を特徴とする。本明細書で使用するところの、「トランスジェニック非ヒト哺乳動物 (transgenic non-human mammal)」には、創始トランスジェニック非ヒト哺乳動物ならびに創始動物の子孫が含まれる。核酸構造物には、インスリン分解ポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドに作用可能に連結された調節核酸配列が含まれ、それにはI I型糖尿病関連表現型に関連した少なくとも1つのアミノ酸置換が含まれる。とりわけ有用な置換は以上で記載している。核酸構造物は、標準の組換え体DNA技術を介して産出できる。

【0050】

トランスジェニック非ヒト哺乳動物は、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、馬、およ

びウサギなどの家畜動物、ラット、モルモット、マウスのような齧歯類、およびヒヒ、サルおよびチンパンジーのような非ヒト霊長類であってよい。トランスジェニックマウスがとりわけ有用である。

【0051】

本技術分野で公知の種々の技術を、核酸構造物を非ヒト哺乳動物に導入し、トランスジェニック非ヒト哺乳動物の創始系を産出するのに使用できる。そのような技術には、プロヌクレアー マイクロインジェクション（米国特許第4873191号）、生殖細胞系へのレトロウイルス仲介遺伝子移入（Van der Putten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:6148, 1985）、胚幹細胞内への遺伝子ターゲティング（Thompson et al., Cell, 56:313, 1989）、胚のエレクトロポレーション（Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803:1983）およびin vitroでの体細胞の形質転換と、続く核移植（Wilmut et al., Nature, 385(6619):810-813, 1997、およびWakayama et al., Nature, 394:369-374, 1998）が限定はしないが、含まれる。

【0052】

いったんトランスジェニック非ヒト哺乳動物が作製されると、インスリン分解ポリペプチドの発現は、標準の技術を用いて評価できる。初期スクリーニングを、サザンプロット解析およびPCRによって実施し、トランス遺伝子の取り込みが行われたかどうかを決定することができる。例えば、サザン解析の記述に関して、Sambrook et al., 1989, 「分子クローニング、研究室マニュアル（Molecular Cloning, A Laboratory Manual）」第二版、Cold Spring Harbor Press, Plainview; NYの第9.37-9.52項を参照のこと。

【0053】

トランスジェニック非ヒト哺乳動物の組織中のインスリン分解ポリペプチドをコードしている核酸配列の発現は、動物から得た組織標本のノザンプロット解析、in situハイブリダイゼーション解析、および逆転写酵素PCR（RT

ーPCR)を含むが、それらに限定されない技術を用いて評価できる。

【0054】

本発明について以下の実施例においてさらに記載するが、これらは請求項に記載した本発明の範囲を限定しない。

【0055】

【実施例】

実施例1－材料と方法：

純系Fischer-344 (F344) ラットを、チャールズリバー ラボラトリーズ (Charles River Laboratories) より購入し、兄弟姉妹交配により維持した。ラットは水および食べ物を自由に得られるようにし、12時間の昼夜サイクル (6 am/6 pm) で飼育した。特定のラットには120日齢から、2%のコレステロール、20%のオリーブ油、および0.5%の胆汁酸を標準食に混合した高脂肪食餌を与えた。

【0056】

ラット種GKを、Galli et al., Nature Genet., 1996, 12:31~37に記載のように得、繁殖させた。GK由来の遺伝的間隔を、10回の連続戻し交配 (F10) および続くヘテロ接合体動物との交雑によりF344の遺伝的バックグラウンドに移転させ、ホモ接合体コンジェニック種を確立した。それぞれの世代において、Niddm1領域からの遺伝マーカーを、GK-感受性ハプロタイプの完全性を証明するために用いた。Niddm1e、Niddm1f、Niddm1cコンジェニック種を、F344との12の連続戻し交配、続いて交配により繁殖させ、ホモ接合体系統を確立した。

【0057】

腹膜内のグルコース耐性試験：

95~225日齢のオスのラットに対し、前記Galli et al., 1996, に記載のように腹膜内グルコース耐性試験 (IPGTT) を行なった。動物を6~7時間絶食させた。体重1kg当たり2.0gのグルコース注入後、0 (基線)、15、30、60、および90分後に血中グルコース濃度を測定した。また0、15、30分後に血清免疫応答性インスリン濃度を測定した。表1

、2、および3中の血清インスリン濃度はラットインスリンに対するELISA (Merco dia AB, Uppsala, Sweden) により、製品に記載の通り測定した。ELISA解析から得たインスリン値 (Tg/l) を、174倍し、pmol/lに変換した。曲線下面積 (AUC) を、基線、15、30、60および90分でのグルコース測定値 (mmol/l×分) から台形の法則に従い計算した。図2に示したグルコース値およびインスリン値を対応するF344の平均値との割り算により標準化し、続いて表2に示すF344の平均値を掛けた。図2に示した実験におけるF344のグルコース平均値は、5.0 (基点)、18.6 (15分)、13.8 (30分)、6.6 (60分)、そして6.2 mmol/l (90分) である。相当するインスリン平均値は、63 (基点)、200 (15分)、および215 pmol/l (30分) である。

【0058】

脂質解析：

トリグリセリド、全コレステロール、およびHDLコレステロールの血清濃度をVitros TRIG Slides、Vitros CHOL Slides (Johnson & Johnson Clin. Diagn. Inc., USA)、およびLiquid N-geneous HDL-c reagent kit (Biomed-RK, Jonkoping, Sweden) を用いて測定した。

【0059】

脂質生成と脂質分解：

オスのラット (75日齢) を、二酸化炭素麻酔後、断頭し、精巣上体の脂肪蓄積物 (1~2g) を取り除いた。Kamei et al., Pediatr. Res., 1997, 41:563~567に記載のように脂肪細胞を調製した。脂質内へのグルコース取り込み (脂質生成) の研究を、細胞へのグルコース輸送が速度限界である、グルコース濃度1 TMで行なった。脂肪細胞を40 mg/mlのアルブミン (シグマ ケミカル社 (Sigma Chemical Co.), St. Louis, MO)、0.2 TMの [³H]-グルコース (5×10⁶ cpm)、1.0 TMの非標識グルコース、および指示濃度のインスリンを含

む、2% (v/v) 濃度の0.5 mlのケルビス リンガー (Krebs Ringer) リン酸緩衝液 (KRP) 中でインキュベートした。それぞれのインスリン濃度において、37℃で2時間、3回解析を行い、4℃まで急冷することにより反応を終わらせた。脂質へのグルコースの取り込みを、Moody et al., *Horm. Metab. Res.*, 1974, 6:12~16に記載のように、6.0MのH₂SO₄ 45Tlおよびトルエン4.0mlを2、5-ジフェニルオキサゾール (PPO) と混合し、脂肪細胞を含むそれぞれのバイアルに加えることにより測定した。バイアルをシンチレーション計数の前に一晚、室温にて放置した。脂質分解の特徴付けのために、脂肪細胞を40mg/mlのアルブミン (Sigma) および5.6mmol/lのグルコースを含むKRP緩衝液中で37.0℃にて2時間インキュベートした。最終の脂肪細胞懸濁液は1% (v/v) であった。インキュベーション終了後、培養液の部分標本を、脂質分解の指標として用いたグリセロール放出の解析のために取り除いた。最大脂質分解を評価するために、ノルアドレナリン (1nmol/l~0.1mmol/l) をインキュベーション培地に加えた。脂質生成と脂質分解は、脂肪細胞の大きさのみに依存する違いを除去するために、細胞面積当たりで表した。最大インスリン誘導脂質生成を、最大でのグルコース取り込み量からインスリンが存在しない時のグルコースの取り込み量を引いた差として計算した。最大ノルアドレナリン誘導脂質分解の刺激 (応答) は、最大グリセロール放出としてそれぞれの個々の投与-応答曲線から、ノルアドレナリンが存在しない倍の最大グリセロール放出量を引いたものとして計算した。最大効果の50% (EC₅₀、感受性) を産出したノルアドレナリン濃度またはインスリン濃度を個々の投与-応答曲線から計算した。

【0060】

インスリンmRNA解析:

脾臓中のラットインスリン遺伝子、Ins1およびIns2のRNAレベルを、半定量RT-PCRにより測定した。5ヶ月齢のオスのラットを7時間絶食させ、脾臓をすぐに、またはグルコース投与後に摘出した。後者の場合、グルコース (2g/kg体重、続いて1g/kg体重) を0分後と60分後に腹腔内に注

射し、ラットを120分後に犠牲死させた。全脾臓RNA (0.75Tg) を、BRL Superscript II (ライフ テクノロジーズ (Life Technologies)) を用いて、製品に記載の通りに、全量20Tl中で逆転写した。Ins1およびIns2の2つの転写物を両方のインスリン遺伝子に共通のプライマー (5'-TTTATTCATTGCAGAGGGGT-3'、SEQ ID NO:1) を用いて逆転写した。cDNA反応 (5Tl) をDynaZyme DNAポリメラーゼおよび緩衝液 (Finnzymes Oy) を含む25TlのPCR溶液中に直接導入した。Ins1およびIns2遺伝子を、³²P標識した特異的なプライマー (Ins1プライマー: 5'-GTGACCAGCTACAATCATAG-3'、SEQ ID NO:2、および5'-GTGCCAAGGTCTGAAGATCC-3'、SEQ ID NO:3; Ins2プライマー: 5'-GTGACCAGCTACAGTCGGA-3'、SEQ ID NO:4、および5'-GTGCCAAGGTCTGAAGGTCA-3'、SEQ ID NO:5) を用いた分離反応にて、94℃にて3分間変性させ、続いて94℃にて30秒間変性させ、62℃にて30秒間アニーリングし、72℃にて1分間伸張させる20サイクル、最終伸張は72℃にて7分間を行なうことにより、増幅した。インスリン特異的産物がサイクル24まで指数関数的に増大した。試料 (15Tl) を6%のポリアクリルアミドゲル上で分離し、乾燥させ、放射能で可視化し、リン光体イメージャー解析 (Fujix BAS 1000) により定量化した。

【0061】

遺伝子型解析およびマーカーの位置測定:

ラットを、それぞれの対の一つのプライマーを標識するために、³³P-KATPを用いたことを除いては、Jacob, H. J. et al., Cell, 1991, 67:213~224に記載のようにマイクロサテライトマーカーのPCR増幅により、遺伝子型決定した。新規マーカーの遺伝的マッピングのために、GKおよびF344ラットの初めのF2交雑ラットからのもっとも極端なグルコース値を持つ45匹のラットを遺伝子型決定し、マーカーをコンピューターパッケージ、Mapmaker/exp3.0を用いて遺伝子マップ上に位置付

けた。

【0062】

新規RFLPマーカーの生成およびサザンブロット解析：

ハイブリダイゼーションプローブをRT-PCRまたはゲノムPCRにより、入手可能なラットcDNA配列および遺伝子特異的なプライマーを用いて合成した。全RNAを前記のように調製した。6TgのRNAをBRL Superscript II（ライフ テクノロジーズ（Life Technologies））を用いて、製品に記載の通り転写した。Jak2プローブに対しては、1日齢のラット全体を用いて、トータルRNAを逆転写酵素反応（cDNAプライマー：5'-AAGGGCCCCGTGGACACGAG-3'、SEQ ID NO：6）より調製した。2T1の逆転写酵素反応液を、96℃にて4分間の変性、続いて96℃にて30秒間の変性、55℃にて1分間のアニール、72℃にて2分間の伸長の35サイクル、そして72℃にて7分間の最終伸張というPCRプロファイルを用いた、連続PCR増幅（プライマー：5'-AAGGGCCCCGTGGACACGAG-3'、SEQ ID NO：6、および5'-GAAGAGCAAAAGCCCACCTG-3'、SEQ ID NO：7）に導入した。jak2遺伝子は、GK中の断片長が8.6kb、F344では6.4kbを持つHind III RFLPにより、位置決定した。全脾臓RNA由来のPnlip mRNAを、5'-ACTACAGAAGTTGAACACTCTG-3'（SEQ ID NO：8）の核酸配列を持つプライマーを用いて逆転写した。PCRの条件は、アニールの温度が50℃であったことを除いてはjak2反応と同一であった（プライマー：5'-CGATGCCCAGTTGTGGATG-3'、SEQ ID NO：9、および5'-ACTACAGAAGTTGAACACTCTG-3'、SEQ ID NO：10）。最初の増幅からの1T1を第二ネスト化PCRの鋳型として用いた（プライマー：5'-ACTTAGGATTTGGAATGAGC-3'、SEQ ID NO：11および5'-TTGGGTAGAGTTGGGTTGAT-3'、SEQ ID NO：12；アニールを53℃にて行なった以外はJak2と同様の条件）。StuI RFLPを、Pnlip遺伝子を遺伝的に位置決定するために用

いた。GK中の断片は18kbであり、F344中では14および4kbであった。Htr7遺伝子はPnlipと同様の条件のゲノムPCRにより増幅した（第一PCR増幅のプライマー：5'-CGAAATCATTGGCTGAGACTG-3'、SEQ ID NO:13および5'-GGGTACTCTTCTGAAGTGTGG-3'、SEQ ID NO:14；第二繰り込みPCRプライマー：5'-TGGCTTCTGTCTTCTTCTTGG-3'、SEQ ID NO:15および5'-CTGCTTCCTTACCTGTCCTTA-3'、SEQ ID NO:16）。MspI RFLPを、GKで5.5kbおよびF344で4.5kbの断片を生じさせたPnlipに対して同定した。サザンブロット解析を、ラット肝臓から抽出し、適切な制限エンドヌクレアーゼで分解した高分子量DNA（10Tg）で行なった。0.8%アガロースゲル中での分画およびナイロン膜（Zeta-probe、Bio-Rad）への転写後、³²P標識RFLPプローブ（ランダムプライミング）を用いて、膜をプローブ化した。

【0063】

Ideの遺伝的位置決定：

ハイブリッド形成のためのIdeプローブを、入手可能なラットcDNA配列（ジーンバンク受け入れ番号（Genbank Accession No.）X67269 S53969）および遺伝子に特異的なプライマーを用いてRT-PCRにより合成した。逆転写反応のために、トータルRNAを、前記のように1日齢ラット全体から調製した。6TgのRNAを、BRL Superscript II（ライフ テクノロジーズ（Life Technologies））を用いて、製品に記載の通りに、全量で20Tl中で転写した。Ide mRNAを5'-AGCTGGTGGACAAACAGGAG-3'（SEQ ID NO:17）の核酸配列を持つプライマーを用いて逆転写し、2Tlの逆転写酵素反応を続けるPCR増幅（プライマー：5'-GTGAACCTGCTGATTAAG-3'、SEQ ID NO:18および5'-AGCTGGTGGACAAACAGGAG-3'、SEQ ID NO:17）に導入した。使用したPCRプロフィールは、94℃にて4分間の変性、そして94℃

にて30秒間の変性、55℃にて1分間のアニール、および72℃にて2分間の伸張の30サイクル、および72℃にて7分間の最終伸長であった。サザンブロット解析を前記のように行なった。HincII RFLPを、GKでは2.7 kb、F344では0.7 kbの断片を産出したと同定した。

【0064】

ラットIde cDNAの配列決定：

遺伝子特異的なプライマーを用いたRT-PCRにより増幅した3128 bpのラットIde cDNA断片を配列決定した。6 Tgのラットの肝臓から調製したトータルRNAを5'-CTGTTTGTCTCTCTAATTGC-3' (SEQ ID NO:19)の核酸配列を持つcDNAプライマーを用いた2 Tl逆転写酵素反応に用いた。逆転写酵素反応の2 Tlを、Expand Long Template PCR System (Boehringer Mannheim)を用いて、製品に記載の通りにPCR反応を行なった (PCRプライマー: 5'-ATGCGGAACGGGCTCGTGTG-3'、SEQ ID NO:20および5'-AGCCAGAACTACTCAAAGC-3'、SEQ ID NO:21、PCRプロファイルは、94℃にて2分間、そして30サイクルの、94℃にて10秒間、54℃にて30秒間、68℃にて2.5分間、ただし最後の20サイクルにおいてはそれぞれ68℃にて20秒間延長し、そして68℃にて7分間の最終伸長である)。RT-PCR産物のDNA配列をABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready ReactionキットおよびIde特異的プライマーを用いて、ABI PRISM 377セミオートマチックシーケンサー (アプライド バイオシステムズ (Applied Biosystems)、USA)にて決定した。

【0065】

プラスミド構築およびCOS1細胞トランスフェクション：

GKおよびF344からのIde mRNAを、上述したように、制限部位を伴って伸長するプライマーを用いて、RT-PCRにて増幅した。完全な翻訳領域を含む得られた3.1 kb cDNA産物を、サイトメガロウイルスプロモー

ターの制御下、発現ベクターpCMV4 (D. W. Russel, Dept. of Mol. Gen., University of Texas Southwestern Medical center) のBglIIおよびMluI制限部位内にライゲーションした。得られた構造物pCMV4-Ide (GK) およびpCMV4-Ide (F344) 内のIde cDNA挿入物を配列決定し、PCR人工産物を排除した。内部制限部位を使用して、GK配列変異体産出pCMV4-Ide (H18R) およびpCMV4-Ide (A890V) を分離した。約 6×10^6 個のCOS-1細胞に、エレクトロポレーション (パイオラッド ジーン パルサー (Bio-Rad Gene Pulser)、Richmond CA; 1200, V25TF) によって、1Tgの β -ガラクトシダーゼベクターpCH110 (ファルマシア (Pharmacia)、Sweden) とともに10TgのpCMV4-Ideプラスミドを一過性にトランスフェクトした。

【0066】

インスリン分解活性のアッセイ：

トランスフェクトしたCOS-1細胞を6cmペトリディッシュにまき、36時間、10%ウシ血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中でインキュベートした。続いて、細胞をPBSにて2回洗浄し、1mg/ml BSAを含む3mlのDMEM中37℃で前インキュベートし、1mg/ml BSAと15,000cpm/mlの 125 I-インスリン (標識インスリンの非標識インスリンに対する比、1:150) を含む2ml DMEM中でインキュベートした。100Tlの3通りの分液を、インスリンの添加後30、45および60分の時点で取り除き、分解していないインスリンを25%TCAの1容量にて、氷上で30分間沈殿させた。サンプルは14000rpmで20分間遠心分離され、上澄みが回収され、分解していないインスリンの量は放射能活性計数によって測定された。細胞をさらに2回PBSにて洗浄し、DMEM中で2時間インキュベートし、トリプシン処理し、PBSにて3回洗浄した。細胞 (およそ 3×10^6 細胞/プレート) を、300Tlの0.5mg/ml BSA含有100mMリン酸緩衝液 (pH=7.4) 中で15秒間の超音波処理によって均質化の

ために回収した。ホモジネートを350gにて10分間遠心し、インスリン分解活性、タンパク質濃度(Bradley ANDREJ)、 β -ガラクトシダーゼ活性(Maniatis ANDREJ)の測定、およびウエスタン解析のために上清を回収した。1Tgタンパク質を含む細胞溶解物の3通り分液を、2,000cpmの¹²⁵Iインスリンを含む100Tlのアッセイ緩衝液中で37℃にて15分間インキュベートし、分解したインスリンの量を上記のように測定した。すべての実験において、(pCMVプラスミドをトランスフェクトした細胞中の)バックグラウンドCOS1インスリン分解活性は、野生型ラットIDEを発現している細胞の20~25%であった。IDEタンパク質は、M. R. Rosner博士(ANDREJ Address)よりご供与いただいたIDE抗体を用いて、標準の手順に従って免疫ブロットにより検出した。

【0067】

実施例2-Niddm1副座の特徴付け：

正常血糖F344ラットのバックグラウンドゲノム上へのGK-Niddm1糖尿病感受性対立遺伝子の移入を可能にするように飼育プロトコルを確立した。長い区画をGKからF344へ移入し、このクロモソーム領域での感受性遺伝子が欠失していないことを確かにした(図1)。コンジュニック種F344.GK-Niddm1a(Niddm1a)のGK特異的領域は、52 ∇ 3cM長であり、およそ15cMの追加的GK対立遺伝子が隣接したNiddm1に関してすでに定義された、完全な20cM 95%信頼区間を含んだ。多くの亜種をNiddm1aより産出し、Niddm1感受性遺伝子/遺伝子群の局在を定義した。これらの種のうち2つ、F344.GK-Niddm1a(Niddm1b)およびF344.GK-Niddm1i(Niddm1i)が、28 ∇ 1cMおよび22 ∇ 1cMのGK間隔を保持した。2つのGK領域を分離している2つのマーカー(Cyp2c12およびD1Mgh29)がF344対立遺伝子に関してホモ接合体であるので(図1)、Niddm1bとNiddm1iにおけるGK領域は、個別であり、重なり合っていない。すべてのコンジュニック種を、戻し交配10世代を経、遺伝的に純粋な動物を得た。種の純粋さを確認するために、ゲノム幅アッセイを、平均20cMの空間を持つ111マーカーで実施

した。糖尿病関連表現型に関する公知の座を解析するために特別に注意を払った。GK由来対立遺伝子の残余はみられなかった。

【0068】

IPGTTを用いて、もともとのF2交雑種中のNiddm1座を想定し、またコンジェニック種を特徴付けするのに適用した。さらなる動物をテストするために、IPGTTをより老齢ラットにて実施した（70日と比較して95日）。完全なNiddm1クロモソーム領域（52cM）を持つNiddm1aラットは、IPGTTの間、グルコース耐性においてF344と明らかに異なった（図2A）。F344と比較して、グルコースAUCがNiddm1a（ $p=0.0007$ ）、Niddm1b（ $p=0.002$ ）およびNiddm1i（ $p=0.00001$ ）にて有意に高かった。15および30分の時点での血清インスリン濃度は、F344でのものに比べてNiddm1iにて有意に低かった（ $p=0.01$ および 0.002 ）。F344ラットでNiddm1a、Niddm1bまたはNiddm1iを比較したときに、本実験では体重の差は観察されなかった。もっとも明白な差は、グルコース注入の15分後に観察され、Niddm1aの平均グルコース濃度がF344（ $p=0.0005$ ）でのものよりも 4.0 mmol/l （26%）高かった。また、Niddm1座の分離部分を持つ2つのコンジェニック種は、対照F344ラットと比較して有意に高い食後グルコース濃度を示した。

【0069】

対照F344ラットと比較した、Niddm1bおよびNiddm1iのIPGTTの結果を図2Bに示している。グルコース注入後15分の時点で、Niddm1bとNiddm1iラットは、F344にくらべて 2.3 mmol/l （15%）および 4.7 mmol/l （31%）高いグルコース濃度を示した（ $p=0.008$ および $p=0.00005$ ）。2つの亜種（Niddm1bおよびNiddm1i）に関するF344に対するAUC増加の合計は、親株（Niddm1a）のAUC増加よりも明確に大きかった。Niddm1aの171と比較して、Niddm1bおよびNiddm1iの合計AUCは325であり、このことは明らかに、非対立遺伝子相互作用（エピスタシス）がNiddm1座内

で働いていることを示唆している。

【0070】

Niddm1bと比較した場合のNiddm1iの識別特徴は、15および30分の時点での有意に低い血清インスリン濃度である ($p=0.03$ および $p=0.002$)。注入後15および30分の時点で、Niddm1iのインスリン値は、F344に比べて、 385 pmol/l (27%, $p=0.012$) および 294 pmol/l (24%, $p=0.002$) 低かった (図2D)。F344と、Niddm1aまたはNiddm1bいずれかを比較した場合に、インスリン濃度に有意な差は観察されなかった (図2CおよびD)。Niddm1iとNiddm1b両方が、グルコース濃度に影響を与えるが、クロモソーム1の異なる部分をカバーしており、*in vivo*でのグルコース刺激インスリン分泌の主要な差違を示しているので、Niddm1座が、少なくとも2つのグルコース恒常性に影響を与える分離遺伝子含んでいることが明らかである。

【0071】

実施例3-Niddm1bおよびNiddm1iでの糖尿病進行:

Niddm1bおよびNiddm1i座でのGK対立遺伝子に関連した糖尿病表現型をさらに調査するために、コンジェニックラットを、見込み研究において、異なる年齢で研究した。座におけるそれぞれのGK体質遺伝子の表現型的効果の特徴付けするために、GK/F344ヘテロ接合体動物も研究した。ヘテロ接合体動物は、Niddm1bまたはNiddm1iをF344と戻し交配して産出した。これらの動物はNiddm1b/F344およびNiddm1i/F344と表示し、各座でのヘテロ接合体性質を示した。F344ラットからのホモ接合体 (GK/GK) またはヘテロ接合体 (GK/F344) 中にNiddm1bまたはNiddm1i座を持つオスラットに、65および95日の時点でIPGTTを実施した。185日齢の時点で、血中グルコース、血清インスリン、トリグリセリド、総コレステロールおよびHDLコレステロールの基礎レベルを決定し、続いて、動物を犠牲死させ、精巣上体脂肪貯蔵体を計量した。

【0072】

65日の時点で、Niddm1bとNiddm1b/F344が、F344ラ

ットと比較して、IPGTTの間の早い時点（15および30分）で、食後グルコース濃度（mmol/l）のわずかな上昇を示した（表1）。しかしながら、基礎および30分血漿インスリン濃度（pmol/l）が、Niddm1bおよびNiddm1b/F344において有意に高かった（表1）。

【表1】

表 1

65日齢の時点でのNiddm1コンジェニックおよびF344での糖尿病関連表現型

表 現 型	F344 (n = 15)	Niddm1b/F344 (n=12)	Niddm1b (n=11)	Niddm1i/F344 (n=8)	Niddm1i (n=11)
体 重 (g)	207 ± 3	216 ± 4	228 ± 4***	202 ± 4	197 ± 5
グルコース 0分	4.8 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.6 ± 0.2	4.7 ± 0.1
グルコース 15分	15.9 ± 0.4	17.0 ± 0.5	17.3 ± 0.6*	15.4 ± 1.0	17.2 ± 0.5*
グルコース 30分	9.4 ± 0.3	10.3 ± 0.4	10.6 ± 0.5*	8.2 ± 0.7	10.5 ± 0.4*
グルコース 60分	4.9 ± 0.2	5.2 ± 0.3	5.5 ± 0.2	6.0 ± 0.1**	4.9 ± 0.1
グルコース 90分	4.8 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.6 ± 0.2*	4.8 ± 0.2
グルコース AUC	705 ± 12	755 ± 18*	774 ± 20**	712 ± 26	748 ± 18
インスリン 0分	77 ± 7	109 ± 9**	122 ± 22*	78 ± 10	62 ± 18
インスリン 15分	1,234 ± 182	1,259 ± 178	1,263 ± 143	1,111 ± 163	542 ± 76**
インスリン 30分	498 ± 68	857 ± 64	980 ± 153**	351 ± 74	398 ± 68

すべての値は、平均±平均標準偏差 (sem) で示している。

各コンジェニック種は、F344と比較し(スチューデントT検定)、有意な差を示している。*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

【0073】

Niddm1bおよびNiddm1b/F344での基準インスリン濃度（pmol/l）は、F344と比較して、58%および42%高く、注入後30分時点の相当する増加は、97%および72%であった。図2で示した実験にした

がって、中年齢（95日）Niddm1bラットでの食後グルコース濃度（mmol/l）はF344での濃度に比べて有意に高かった（表2）。

【表2】

表 2

95日齢の時点でのNiddm1コンジェニックおよびF344での糖尿病関連表現型

表 現 型	F344 (n = 15)	Niddm1b/F344 (n = 12)	Niddm1b (n = 11)	Niddm1i/F344 (n = 8)	Niddm1i (n = 11)
体 重 (g)	279 \pm 4	280 \pm 4	305 \pm 5***	275 \pm 4	270 \pm 6
グルコース 0分	5.1 \pm 0.1	4.9 \pm 0.1	5.6 \pm 0.3	5.3 \pm 0.1	5.8 \pm 0.2**
グルコース 15分	15.1 \pm 0.5	15.4 \pm 0.6	17.4 \pm 0.7**	16.6 \pm 1.1	18.5 \pm 0.8***
グルコース30分	12.2 \pm 0.3	12.2 \pm 0.5	14.1 \pm 0.7**	13.1 \pm 0.4	14.0 \pm 0.4***
グルコース 60分	7.5 \pm 0.3	7.2 \pm 0.3	8.1 \pm 0.5	7.3 \pm 0.3	8.5 \pm 0.3*
グルコース 90分	6.1 \pm 0.2	6.0 \pm 0.2	7.1 \pm 0.2**	6.6 \pm 0.2	7.2 \pm 0.2***
グルコース AUC	855 \pm 21	846 \pm 29	971 \pm 35**	901 \pm 31	1001 \pm 28***
インスリン 0分	210 \pm 27	208 \pm 23	238 \pm 80	260 \pm 38	225 \pm 48
インスリン 15分	1,425 \pm 205	1,589 \pm 141	1,166 \pm 287	1,787 \pm 142	810 \pm 193*
インスリン 30分	1,200 \pm 186	1,507 \pm 138	1,141 \pm 297	1,563 \pm 168	792 \pm 189

すべての値は、平均 \pm 平均標準偏差 (s e m) で示している。

各コンジェニック種は、F344と比較し(スチューデントT検定)、有意な差を示している。

*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

【0074】

Niddm1b/F344とF344の間で、グルコース濃度における差は観察されなかった。この日齢で、ヘテロ接合体動物中の血清インスリン濃度はまだわずかに高かった（15および30分）。反対に、ホモ接合体動物で、わずかなインスリン減少が観察された（表2）。Niddm1bでのインスリンレベルは、IPGTTの間、F344とは有意に異なっていなかったけれども、インスリン分泌が、グルコース濃度の増加を考慮して減損された。

【0075】

より後期（185日）に、Niddm1bでの基準グルコースおよび基準インスリン濃度はF344ラットにおける濃度よりも有意に高かった（表3）。トリグリセリドおよびHDLコレステロールの濃度もまた、Niddm1bにおいて、F344ラットにおけるよりも有意に高く（表3）、一方で総コレステロール濃度は異ならなかった。Niddm1bラットでのコレステロール濃度に比べて、ヘテロ接合体ラット（Niddm1b/F344）中の総コレステロール濃度およびHDLコレステロール濃度両方が、F344ラット中の濃度よりも有意に低かった。Niddm1b/F344とF344の間では基礎グルコース、インスリン又はトリグリセリド濃度における差異は観察されなかった。更に、Niddm1bラットは本実験群（表1～3）で、F344ラットに比べて有意に重く（65、95および185日の時点でそれぞれ10%、9%および6%）、精巣上体脂肪重量は18%まで増加した（表3）。Niddm1b体重の増加は、第一実験では観察されず、このことは、単に幼少期の間の栄養の違いの結果を反映している可能性が排除できない。しかしながら、体重に対する遺伝的関連が、Niddm1bに相当する領域でのGKラットの本来の遺伝的解析で観察された。上記Galliet al., 1996を参照のこと。

【表3】

表 3

185日齢の時点でのNiddm1コンジェニックおよびF344での糖尿病関連表現型

表 現 型	F344 (n = 9)	Niddm1b/F344 (n = 11)	Niddm1b (n = 10)	Niddm1i/F344 (n = 8)	Niddm1i (n = 10)
体 重 (g)	365 \pm 9	354 \pm 4	389 \pm 4*	356 \pm 4	350 \pm 6
基礎グルコース (mmol/l)	5.7 \pm 0.1	5.6 \pm 0.2	6.2 \pm 0.1**	5.9 \pm 0.1	5.7 \pm 0.1
基礎インスリン (pmol/l)	378 \pm 71	423 \pm 48	631 \pm 38**	408 \pm 47	472 \pm 50
脂肪重量 (g)	10.5 \pm 0.7	9.4 \pm 0.2	12.4 \pm 0.3*	9.8 \pm 0.4	10.2 \pm 0.4
トリグリセリド (mmol/l)	2.30 \pm 0.09	2.07 \pm 0.13	3.03 \pm 0.16**	2.25 \pm 0.09	2.16 \pm 0.14
総コレステロール (mmol/l)	2.12 \pm 0.05	1.87 \pm 0.03***	2.22 \pm 0.05	2.18 \pm 0.02	2.31 \pm 0.08
HDL コレステロール (mmol/l)	0.96 \pm 0.02	0.87 \pm 0.02**	1.05 \pm 0.03*	1.05 \pm 0.02**	1.08 \pm 0.04**

すべての値は、平均 \pm 平均標準偏差 (s e m) で示している。

各コンジェニック種は、F344と比較し(スチューデントT検定)、有意な差を示している。

*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001。

【0076】

Niddm1iラットにおいて、95日での食後グルコース濃度は、F344ラットと比較して、有意に高かった(表2)。さらに、第一実験群(表2)と同様に、IPGTTの間の血清インスリン濃度はNiddm1iラットにおいてより低かった(表2)。また、65日齢Niddm1iラットにおいて、インスリン濃度が、F344ラットと比較して低く、このことは、Niddm1iにおける明白な、そして早期のB細胞欠失を示唆している。グルコース注入の15分後に、血中グルコース濃度がわずかに上昇したにもかかわらず、Niddm1iラットでのインスリン濃度は、F344ラットのものの56%であった(表1)。

65または95日の時点で、Niddm1i/F344とF344ラット間で、グルコースまたはインスリン濃度における主要な差はみられなかった。185日齢にて、Niddm1iおよびNiddm1i/F344両方でHDLコレステロールが高いことを除いて、Niddm1i、またはNiddm1i/F344いずれもが、任意の解析した表現型に関してF344と異ならなかった（表3）。

【0077】

実施例4－脂肪細胞でのインスリン活性：

Niddm1表現型をさらに特徴付けするために、脂肪細胞を、75日齢のラットの精巣上体脂肪貯蔵から単離した（Niddm1i、Niddm1b、F344およびGK）。脂質生成を、インスリンの濃度の増加に対する応答での、脂質内への放射性グルコースの取り込みとして測定した。F344ラットと比較して、Niddm1bとNiddm1iラット両方からの脂肪細胞において、有意に低い基準およびインスリン誘導脂質生成があったが、GKラットからの脂肪細胞よりも有意に高く、このことは、インスリンの活性の重度の減少を示している（図3）。コンジェニック種Niddm1bとNiddm1iの間で有意な差はなかった。インスリン誘導脂質生成のEC₅₀は、インスリン感受性での種内差を表さなかった。さらに、脂肪分解を、単離した脂肪細胞からのグリセロール放出を測定することで研究した。基礎脂肪分解またはノルアドレナリン誘導脂肪分解のいずれでも有意な差は観察されなかった。このことは、インスリン活性にて観察された差が、経路特異的欠失を反映しているが、一般的脂肪細胞不全を反映してはいないことを示している。

【0078】

実施例5－候補遺伝子機能およびシンテニー保存：

インスリン1遺伝子（Ins1）は、Niddm1i内に含まれ、グルコース恒常性減損を引き起こす変異の候補であったGK区画内で局在化されている。両方の種が、膵臓において、同様の比較的多量のIns1とIns2 mRNAを含んでいるけれども、GKおよびF344ラット間のIns1プロモーター配列での差が、転写開始部位に関連したヌクレオチド位置－258bpで報告されてき

た。上記Galli et al., 1996。さらに詳細に、本遺伝的変異体の潜在的な役割を調査するために、Ins1およびIns2に対する安定状態mRNAの膵臓濃度を、7時間の断食期間後、および繰り返しグルコース注入の2時間後、GK、F344およびNiddm1iラット (n=4) での半定量RT-PCRにて見積もった (図4)。F344と比較して、インスリン応答の減損がIPGTTの間に見られたにもかかわらず、総インスリンmRNA濃度は、Niddm1iラットで30%高かった。しかしながら、Ins1とIns2の相対的発現は、基準またはグルコース刺激状態いずれにおいても、種間で異ならなかった。したがって、Ins1は、Niddm1i表現型に対する候補として排除される。インスリンRNAデータは、Niddm1iで観察されたインスリン分泌の欠失が、インスリン転写の調節の下流に局在することを示している。

【0079】

ヒトおよびマウスにおけるNiddm1に相当する相同領域の情報が、候補遺伝子の局在化、およびI型糖尿病に関連した他の感受性座を伴うNiddm1ラット座、またはヒトまたはマウスでのその関連した表現型の比較のために重要である。ラットクロモソーム1上で先にマップされた遺伝子およびラット、ヒトおよびマウス間で保存されたシンテニーによっておおそ導かれて、3つの新規な遺伝子が、ラットクロモソーム1上のNiddm1座にマップされた。これらは、(図1で太字で示した) Janus キナーゼ2 (JAK2)、5-ヒドロキシトリプタミンレセプター7 (HTR7)、および膵臓リパーゼ (PNLIP) をコードしている遺伝子である。このことは、Niddm1座とヒトクロモソーム領域9p24間の相同性を示しており、さらには、ラットクロモソーム1、ヒトクロモソーム領域10q24-26、およびマウスクロモソーム19間のシンテニー保存を確かにしている (表4)。

【表4】

表 4

ラットクロモソーム1上のNiddm1領域の遺伝子、
およびヒトおよびマウス相同物の局在*

遺伝子名	遺伝子記号	クロモソーム局在		
		ラット ¹	ヒト	マウス ²
グルタチオン-S-トランスフェラーゼ pi	Gstp	118	11q13	19 (0)
ホスホリラーゼ、グリコーゲン: 筋肉	Pygm	118	11q13.1	19 (2)
Janus キナーゼ 2	Jak2	133	9p24	19 (24)
5-ヒドロキシトリプタミンレセプター7	Htr7	140	10q24	19 (33)
シトクロームP450、サブファミリーI ic	Cyp2c	142	10q24.1	19 (27)
グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ1	Got1	144	10q24.1-25.1	19 (37)
インスリン1	Ins1	154	NA	19 (49)
膵臓リパーゼ	Pnlp	159	10q26.1	19 (29)

* バックグラウンド情報はラットゲノムデータベース(Rat Genome Database <http://ratmap.gen.gu.se/>), マウスゲノムインフォメーション(Mouse Genome Information: <http://www.informatics.jax.org/>), およびゲノムデータベース(Genome Database: <http://www.gdb.org/>)より得た。

1 ラットクロモソーム1の動原体末端に局在する、マーカーD1Mgh2からcMの距離。

2 動原体からのcMでの距離は、クロモソーム番号の後ろに括弧で示した。

【0080】

実施例6-コンジェニック亜種および関連表現型:

Niddm1bのさらなる特徴付けのために、コンジェニック亜株を確立した。Niddm1bラットを、F344に戻し交配し、組換え体をGK区画内で同定した。GK区画の異なる部分をカバーしている3つの組換え体を選択し、ホモ接合体株をGK対立遺伝子に関して確立した。得られたコンジェニック種、F344. GK-Niddm1c (Niddm1c)、F344. GK-Niddm1f (Niddm1f)、およびF344. GK-Niddm1e (Niddm1e) は、GK対立遺伝子の、それぞれ、23 ∇ 1cM、7.6 ∇ 1cM、および3.7 ∇ 2cMを保持した(図5)。

【0081】

腹膜内グルコース耐性試験をN i d d m 1を同定するために、ならびにN i d d m 1 bおよびN i d d m 1 i 亜座を定義するために使用したので、同様の試験を、1 c、1 eおよび1 f 種を特徴付けするために適用した。N i d d m 1 b内の感受性遺伝子をマップするために、新規コンジェニック亜種（N i d d m 1 e、N i d d m 1 f、およびN i d d m 1 c）およびF 3 4 4からのラットを、9 5日齢時にI P G T Tにかけた。N i d d m 1 bと同様に、N i d d m 1 eおよびN i d d m 1 f 両方における腹膜内グルコース濃度が、F 3 4 4の場合と比べて有意に高かった（表5）。最も明白な差は、グルコース注入後3 0分の時点で観察され、その時、グルコース濃度は、N i d d m 1 eおよびN i d d m 1 f 両方で2 1 %であった。基礎および3 0分インスリン濃度もまた、F 3 4 4においてよりも有意に高かった。グルコースまたはインスリン濃度における有意な差は、N i d d m 1 cとF 3 4 4の間では観察されなかった。

【表5】

表 5

Niddm1e, Niddm1f, Niddm1c および F344

表 現 型	F344 (n=12)		Niddm1e (n=10)		Niddm1f (n=11)		Niddm1c (n=11)	
	平 均	SEM	平 均	SEM	平 均	SEM	平 均	SEM
66日齢ラット								
体 重 (g)	223	4	195	2	211	4	201	7
グルコース 0分	5.6	0.2	5.6	0.2	5.9	0.2	5.5	0.1
グルコース 15分	16.6	0.7	15.7	0.9	17.5	0.7	17.3	0.3
グルコース 30分	10.1	0.5	10.2	0.7	10.6	0.4	9.0	0.4
グルコース 60分	5.4	0.1	5.2	0.2	5.7	0.2	5.3	0.1
グルコース 90分	5.4	0.1	5.4	0.5	6.1	0.2	5.7	0.2
インスリン 0分	114	13	102	16	145	10	75	12
インスリン 15分	2039	194	1335	195	2039	146	1436	289
インスリン 30分	1112	321	725	137	1159	166	749	163
95日齢ラット								
体 重 (g)	268	4	276	3	277	5	258	5
グルコース 0分	5.3	0.1	5.4	0.1	5.7	0.1	5.6	0.2
グルコース 15分	15.4	0.4	17.2	0.7	17.3	0.7	15.6	0.6
グルコース 30分	12.0	0.3	14.5	0.3	14.5	0.5	11.8	0.5
グルコース 60分	6.8	0.1	8.4	0.3	7.7	0.2	6.1	0.2
グルコース 90分	6.3	0.1	6.7	0.1	6.8	0.3	6.6	0.2
インスリン 0分	201	25	331	24	441	37	246	57
インスリン 15分	2162	167	2425	102	2431	215	2265	373
インスリン 30分	1626	164	2497	93	2405	162	1554	320
120日齢ラット								
体 重 (g)	303	4	314	4	309	5	NA	
基礎グルコース	5.8	0.1	5.0	0.1	5.3	0.2	NA	
基礎インスリン	276	23	386	55	390	36	NA	

【0082】

さらなる特徴付けのために、コンジェニック種を、多量の脂質を含む食事での処置の後に調査した。Niddm1e、Niddm1fおよびF344ラットを、120日齢時点で開始して、実施例1で記述した高脂質食事で処置した。ラットをIPGTTにかけ、トリグリセリド、総コレステロール、およびHDLコレ

ステロールの基準を225日齢時に測定し、続いて動物を犠牲死させ、精巣上体脂肪貯蔵を計量した。この年齢にて、食後グルコース濃度は、Niddm1eおよびNiddm1fにて、F344と比較してまだ有意に高かった（表6）。95日の時点でのIPGTTとは対照的に、グルコース注入後のより遅い時点で差がより顕著であった（表5）。注入後90分の時点で、両コンジェニック中のグルコース濃度は、F344に比べておよそ30%高かった。基礎インスリン濃度は、コンジェニックにおいて、F344に比べて有意に高かったが、しかしグルコース注入後のインスリン濃度は高くなかった。この日齢において、体重および腹膜内脂肪重量両方の増加が観察されたが、しかし、Niddm1eで有意に増加したのみであった。

【表6】

表 6

表 現 型	F344 (n=12)	Niddm1e(n=10)		Niddm1f(n=11)	
	平 均 \forall sem	平 均 \forall sem	P 値	平 均 \forall sem	P 値
185日齢ラット					
体 重	373 \forall 5	386 \forall 4	NS	379 \forall 7	NS
基礎グルコース	4.5 \forall 0.2	5.3 \forall 0.1	0.001	5.2 \forall 0.8	0.02
基礎インスリン	459 \forall 42	553 \forall 71	NS	578 \forall 24	0.03
220日齢ラット					
体 重 (g)	377 \forall 6	400 \forall 5	0.01	384 \forall 8	NS
グルコース 0分	4.8 \forall 0.1	4.9 \forall 0.1	NS	4.9 \forall 0.1	NS
グルコース15分	17.1 \forall 0.3	20.3 \forall 1.3	0.04	17.1 \forall 1.4	NS
グルコース30分	17.7 \forall 0.8	19.4 \forall 0.6	NS	18.5 \forall 0.7	NS
グルコース60分	14.6 \forall 0.7	17.6 \forall 1.0	0.02	17.8 \forall 0.6	0.005
グルコース90分	10.4 \forall 0.4	13.9 \forall 0.9	0.0009	13.4 \forall 0.8	0.001
インスリン 0分	337 \forall 16	480 \forall 46	0.003	410 \forall 24	0.02
インスリン15分	1069 \forall 109	1166 \forall 143	NS	985 \forall 111	NS
インスリン30分	1217 \forall 77	2533 \forall 144	NS	1049 \forall 71	NS
230日齢ラット					
体 重 (g)	368 \forall 4	391 \forall 6	0.004	375 \forall 8	NS
脂肪重量	8.5 \forall 0.3	10.6 \forall 0.5	0.0009	9.3 \forall 0.4	NS
基礎インスリン	314 \forall 31	413 \forall 24	0.02	454 \forall 47	0.02
コレステロール	4.35 \forall 0.13	4.33 \forall 0.20	NS	4.13 \forall 0.15	NS
トリグリセリド	0.66 \forall 0.03	0.76 \forall 0.06	NS	0.61 \forall 0.02	NS
HDL	1.23 \forall 0.07	0.97 \forall 0.02	0.003	1.12 \forall 0.03	NS
LDL	2.80 \forall 0.08	3.00 \forall 0.17	NS	2.77 \forall 0.16	NS

【0083】

実施例2で記述したように、Niddm1bにおける基礎およびインスリン誘導脂肪分解は、F344と比較して有意に減少した。同様の試験をNiddm1b亜種、Niddm1eおよびNiddm1fおよび対照F344にて実施した。脂肪分解はまた、F344と比較して、Niddm1eおよびNiddm1f両方において減少した(図6)。これらのデータに基づいて、Niddm1b糖尿病感受性遺伝子/遺伝子群が、Niddm1eの3.7cM GK区画に局在化される。

【0084】

実施例7—DNA配列解析およびIdeの発現：

候補遺伝子を、ヒトおよびマウスからの遺伝的マッピングデータを用いて同定した。シンテニーが、ラットクロモソーム1ヒトクロモソーム9および10、およびマウスクロモソーム19上のNiddm1領域間で保存されている。先に糖尿病に関する候補として考えられてはいなかった1つの遺伝子は、インスリン分解酵素(IDE)をコードしている遺伝子であり、これは、ヒトクロモソーム10q24およびマウス19にマップされた。Ide遺伝子は、制限断片長多型(RFLP)解析によって、Niddm1eのGK区画内のラットクロモソーム1上に遺伝的にマップされた(図5)。

【0085】

IDEタンパク質構造の変化が、Niddm1eの表現型を説明する可能性を調査するために、IDEのcDNA配列を、GKおよびF344ラットで決定した。遺伝子の完全翻訳部分の配列決定によって、GKとF344ラットの間に3つのヌクレオチドの違いが明らかになり、コード領域の5'—末端に1つ(コドン18)、3'末端に2つ(コドン890および934)である(図7)。これらの2つはアミノ酸変化を起こし、コドン18でのCACからCGCの変化は、結果としてヒスチジンに対するアラニンの置換、コドン890におけるGCGからGTGの変化は、結果としてアラニンに対するバリンの置換となる。第三の変異体はサイレントであり、コドン934の最後の塩基が変化している(GATがGACに)。さらに、IDE cDNA配列を12の他のラット種(DA、PVG/RT1、PVG/Bk、Lew、ACI、BN、Cop、BB、W、SD、

FRLおよびFSL)で決定した。A890V変異体はGKにとって特有であり、一方でH18Rはまた、種DA、ACI、SD、FRLおよびFSLにて見られた(表7)。

【表7】

表 7

種々のラット種のIde遺伝子での配列変異体

種	コドン18	コドン 890	コドン 934
GK	CGC (Arg)	GTG (Val)	GAC
F344	CAC (His)	GCG (Ala)	GAT
PVG	CAC (His)	GCG (Ala)	GAT
LEW	CAC (His)	GCG (Ala)	GAT
BN	CAC (His)	GCG (Ala)	GAT
COP	CAC (His)	GCG (Ala)	GAT
BB	CAC (His)	GCG (Ala)	GAT
Wistar	CAC (His)	GCG (Ala)	GAT
DA	CGC (Arg)	GCG (Ala)	GAT
ACI	CGC (Arg)	GCG (Ala)	GAT
SD	CGC (Arg)	GCG (Ala)	GAC
FRL	CGC (Arg)	GCG (Ala)	GAC
FSL	CGC (Arg)	GCG (Ala)	GAC

【0086】

IDEのGK変異体の効果を研究するために、インスリン分解活性を、*in vitro*発現系で測定した。IDEは、トランスフェクトしたCOS1細胞で過剰発現しており、細胞溶解物の、インスリンを加水分解する能力を研究した。抗IDE抗体を用いたウェスタンブロット解析によって、トランスフェクトしたIDE cDNAが確認された。GK対立遺伝子における2つのアミノ酸変異体、H18RおよびA890Vを、別々に、または組み合わせて研究した。H18

RおよびA890V両方を含むGK対立遺伝子をトランスフェクトしたもとの細胞におけるインスリン分解活性は、対照と比較して34% ($p < 0.001$) 減少した(図8)。2つの変異体を別々に解析した場合、H18Rのみが野生型の活性のわずかな減少(89%)、対照と比較して $p < 0.001$ を示し、一方、A890Vは正常であり、このことは、2つの変異体の相乗作用を示唆している。細胞溶解物において、正常変異体と比較して、インスリン分解におけるGK対立遺伝子に関して差は観察されなかった。

【0087】

Niddm1eは、食後グルコース濃度の増加、単離した脂肪細胞での基礎およびインスリン誘導脂質生成の減損、体重および腹膜内脂肪量の増加、および高インスリン血症を示した。さらに、Niddm1eを、3.5ヶ月の期間、高脂肪食で処理し、続いてこのラットを7.5ヶ月の時点でIPGTTにかけた。この年齢の時点で、F344と比較した場合に、グルコース濃度の最も明白な差が、グルコース注入のさらに後の時点で観察され、より速い時点での若い動物では見られなかった。したがって、糖尿病座Niddm1bは、コンジェニック種Niddm1e中の3cM領域であると再定義される。

【0088】

これらのデータは、IDEをコードしている遺伝子が、GKラットでの糖尿病表現型を部分的に説明しており、細胞内でのその多重活性のいくつかを通して、Niddm1eにおける高血糖およびインスリン耐性を引き起こしている。いくつかの他の研究が、インスリン耐性と糖尿病に関連したインスリンクリアランスの減少を示しており、このことは、インスリン分解における減少が、糖尿病表現型を仲介可能であることを示唆している。可能性のある分子的説明は、末梢組織において、そのレセプターに結合したインスリンの細胞内分解の減少が、インスリンレセプターの、細胞膜へ戻る再循環を阻害し、したがって、細胞内の利用可能なレセプターの数が増加するというものである。

【0089】

実施例8—NiddmCコンジェニック動物：

上記Galliet al., 1996にて記述されたように、ゲノム幅連

結解析を使用して、糖尿病関連表現型に対する遺伝的連結を示しているクロモソーム領域を局在化した。糖尿病関連表現型に対する連結に関する密接なゲノム幅調査のために、GKとF344ラット間で作製した交雑子孫のF2集団を、性および相互交配に関して別々に、すべてのF2動物と一緒に解析した。表8は、少なくとも1つの糖尿病関連表現型に関して、3以上のLOD（オッズ比の対数）を持つ座を記述している。各クロモソーム領域の中央に位置するマーカーを表8に示している。これはおよそ25 cMの中央に局在しており、糖尿病関連表現型に関するこれらのQTLのそれぞれを含む。

【0090】

NiddmC群のコンジェニック動物（NiddmC2、NiddmC3、NiddmC5、NiddmC7、NiddmC9A、NiddmC9B、NiddmC10、NiddmC11、NiddmC13、NiddmC18、NiddmC（13+15）、NiddmC（9+13+15））を、F344上にGKを戻し交配し、各世代で（ドナー）対立遺伝子由来の最大GKを欠失している子孫を選択すること（マーカー補助選別、Whittaker et al., Genet Res., 66（3）：255-65, 1995、およびDarvasi, Nat Genet., 18（1）：19-24, 1998を参照のこと）によって産出した。

【0091】

表9で列記したマイクロサテライトマーカーは、GKとF344の交雑からのF2子孫において同定されたQTLをカバーしている。これらのマーカーは、GKとF344対立遺伝子間を見分け、コンジェニック動物を産出するための戻し交配の後にGK対立遺伝子を表示する。それぞれのコンジェニック種の産出の間に選別した、糖尿病関連QTLを表9に列記し、つづいて各QTL内でのGK由来対立遺伝子を定義したマイクロサテライトマーカーを列記している。この選別したクロモソーム領域外のすべての他の試験したマーカーはF344特異的遺伝子型を示した。バックグラウンドマーカーは、ラットゲノムにそっておよそ50 cMごとに局在し、最大量のGK由来（ドナー）バックグラウンドを欠失している各戻し交配世代での子孫を選択することによって、特異的に選別された。

【0092】

表10は、I I型糖尿病に関連した表現型（肥満、インスリン抵抗性、グルコース不耐および異脂肪血症）を調節する代謝症候群QTLのまとめを提供している。クロモソーム領域に連結した表現型はF2集団で見られる。コンジェニック動物は、各著名な座に関して生成され、表現型は、少なくとも5匹の異なるコンジェニック動物内で確認された。

【表8】

表 8

LODスコア>3のマーカーのリスト

クロモソーム	LOD最大時の マーカー	糖尿病関連表現型に関する 最も高いLODスコア
C1	D1Mit9	4.0
c1	D1Mgh40	3.2
c1	D1Mit18	3.6
c1	D1Mit34	7.3
c1	D1Mgh25	8.7
c1	GTREPB	3.2
c1	D1Mit7	8.0
c1	D1Mgh24	8.5
c1	D1Mgh13	3.6
c1	D1Mit8	5.7
c1	D1Mit14	3.0
c2	D2Mit11	4.6
c2	D2Mit14	3.2
c2	D2N91	3.4
c3	D3Mit8	3.2
c3	D3Rat27	3.1
c4	D4Mit28	3.9
c7	D7Mit28	4.4
c7	D7Rat27	8.6
c7	D7Rat106	3.8
c7	D7Mit6	7.4
c7	D7Mgh23	3.1
c7	D7Mit11	3.5
c7	D7Mit9	3.1
c9	D9Mgh3	4.6
c9	D9Rat104	6.9
c10	D10Rat64	3.3
c10	D10Mit8	4.1
c10	D10Mgh23	5.2
c10	D10Mgh5	5.4
c10	D13Mit11?	3.8
c12	D12Rat22	3.6
c13	D13Mgh16	4.6
c15	D15Rat25	3.1
c17	D17Mgh6	3.7
c18	D18Mit11	4.2
c19	D19Mgh10	3.5
c20	D20Mit5	3.2
c20	D20Rat29	4.7
x	DXMgh8	4.9
x	DXRat16	5.5
x	DXRat20	7.0
x	DXRat103	4.2

【表 9】

表 9

NiddmC コンジェニック動物

NiddmC2:	D2Mgh5, D2Mgh15, D2Mit10, D2Mit11, D2Mgh30, D2Mit22, D2Mgh11, および D2Arb24.
NiddmC3:	D3Mgh19, D3Mit10, および D3Mgh8, および D3Mgh6..
NiddmC5:	D5Mgh5, D5Mit10, D5Mit2, D5Mit11, D5Mit4, D5Mit5, および D5Mgh23.
NiddmC7:	D7Mgh11, D7Mit23, D7Mit7, D7Mit22, D7Mit6, D7Mgh10, および D7Mit5.
NiddmC9A:	D9Mgh3, D9Mit4, D9Mit2, IGFBP5X, および GDNPN1.
NiddmC9B:	D9Mgh3, および D9Mit4.
NiddmC10:	D10Mit15, D10Mit16, D10Mit18, D10Mit9, D2Mit11, D10Mgh6, D10Mit13, D10Mgh5, D10Mit12, D10Mgh4, および D10Mit11.
NiddmC11:	D11Mgh5, D11Mgh4, D11Mgh3, および D11Mgh2.
NiddmC13:	D13Mgh16, D13Mgh2, D13Mit2, および D13Mit5.
NiddmC18:	D18Mit4, D18Mgh5, D18Mgh11, D18Mgh6, および D18Mit11.
NiddmC(13+15)	D13Mgh16, D13Mgh2, D13Mit2, D13Mit5, BMYO, D15Mgh15, D15Mgh8, および D15Mco2
NiddmC(9+13+15):	D9Mit4, D9Mit2, D13Mit2, D13Mit5, D15Mgh8, および D15Mgh9.

【表 10】

表 10

QTLSおよびコンジェニック動物のまとめ

Chr	座 名 ¹⁾	F2集団のクローソーム領域に連結した表現型	コンジェニック産出、c Mでのサイズ	コンジェニック動物での確認表現型	候補遺伝子変異体	遺伝子変異体の機能的結果
1	Niddm1e	PHG, W ²⁾	産出、1.9-5.5	PHG, FI, O ³⁾ , HDL	Idc (H18R+A890V)	30% 活性減少
1	Niddm1i	PHG, PI	産出、18.3-18.8	PHG, FI	-	-
2	Niddm2	W, PHG	産出、69-109	-	-	-
3	"NiddmC3"	W, PI, PHG	産出、30-50	-	-	-
5	"NiddmC5"	W, PHG	産出、35-73	W	-	-
7	Weight1	W	産出、49-58	W	-	-
9	"NiddmC9"	FI, PI	産出、35-71	W, PHG	-	-
10	Niddm3	PHG, PHG W, C, TG	産出、81-111	-	-	-
11	"NiddmC11"	PHG, FI	産出、35-64	-	-	-
13	"NiddmC13"	PHG	産出、40-66	-	-	-
15	"NiddmC15"	W, PI	産出、8-39	-	-	-
18	"NiddmC18"	W, PHG, FI	産出、43-47	-	-	-

1) 引用マークは、暫定名を示す。

2) 重量(W)は、精巢上体脂肪パッドを解剖し、単離した組織を計量することによって測定したより正確な表現型肥満(O)に関連する。

PHG, 食後高血糖

FHG, 絶食高血糖

FI, 絶食インスリン濃度またはインスリン対グルコース比

PI, 食後インスリン濃度またはインスリン対グルコース比

W, 重量

O, 脂肪重量の増加

C, コレステロール

TG, トリグリセリド

【0093】

他の実施形態

本発明が、その詳細な記述と関連して記述される一方で、以上の記述は本発明の範囲を例示する意図であり、限定するものではなく、付随する請求項の範囲に

よって定義される。他の観点、利点および改変は、請求項の範囲内である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Arexis AB

<120> CONGENIC ANIMAL MODELS OF NON-INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS

<130> 11145-009W01

<150> US 09/434,066

<151> 1999-11-05

<160> 23

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

tttattcatt gcagaggggt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

gtgaccagct acaatcatag 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

gtgccaaaggct ctgaagatcc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4	
gtgaccagct acagtcggaa	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 5	
gtgccaaaggt ctgaaggtca	20
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 6	
aaggggcccggt ggacacgag	19
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 7	
gaagagcaaa agcccacctg	20
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 8	
actacagaag ttgaacacto tg	22
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	

<400> 9	
cgatgcccag tttgtgatg	20
<210> 10	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 10	
actacagaag ttgaacacto tg	22
<210> 11	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 11	
acttaggatt tggaatgagc	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 12	
ttgggtagag ttgggttgat	20
<210> 13	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	
<400> 13	
cgaaatcatt ggctgagact g	21
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> primer	

<400> 14 gggtagctctt ctgaactgtg g	21
<210> 15 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 15 tggtctctgt cttcttcttg g	21
<210> 16 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 16 ctgcttcctt acctgtcctt a	21
<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 17 agctggtgga caaacaggag	20
<210> 18 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	
<400> 18 gtgaacctgc tgattaacta ag	22
<210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> primer	

```

<400> 19
ctgtttgtct ctctaattgc
20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 20
atgcggaacg ggctcgtgtg
20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 21
agccagaaac tactcaaagc
20

<210> 22
<211> 4276
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (16)...(3075)

<400> 22
gcggctgcgc ggggt atg cgg aac ggg ctc gtg tgg ctg ctg cac ccc gcg
Met Arg Asn Gly Leu Val Trp Leu Leu His Pro Ala
1 5 10
ctg ccc agc acc ttg cac tcc atc ctc ggc gct cgc ccg cct ccc gtg
Leu Pro Ser Thr Leu His Ser Ile Leu Gly Ala Arg Pro Pro Pro Val
15 20 25
aag cga ctg tgt gga ttc cca aaa caa att tac agc aca atg aat aat
Lys Arg Leu Cys Gly Phe Pro Lys Gln Ile Tyr Ser Thr Met Asn Asn
30 35 40
ccg gcc atc cag aga ata gaa gac cat att gtc aag tct cct gaa gac
Pro Ala Ile Gln Arg Ile Glu Asp His Ile Val Lys Ser Pro Glu Asp
45 50 55 60
aaa cgg gaa tat cgt gga cta gaa ctg gcc aat ggt atc aaa gtg ctt
Lys Arg Glu Tyr Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Gly Ile Lys Val Leu
65 70 75

```

ctc atc agt gat ccc acc acg gac aag tca tca gca gca ctc gac gtg Leu Ile Ser Asp Pro Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ala Leu Asp Val 80 85 90	291
cac ata ggg tca ctg tca gac cct cca aat att cct ggc tta agc cat His Ile Gly Ser Leu Ser Asp Pro Pro Asn Ile Pro Gly Leu Ser His 95 100 105	339
ttt tgt gag cat atg ctg ttt ttg gga aca aag aaa tat cct aag gaa Phe Cys Glu His Met Leu Phe Leu Gly Thr Lys Lys Tyr Pro Lys Glu 110 115 120	387
aat gaa tac agc cag ttt ctc agt gaa cat gct ggg agt tca aat gca Asn Glu Tyr Ser Gln Phe Leu Ser Glu His Ala Gly Ser Ser Asn Ala 125 130 135 140	435
ttt acc agc gga gaa cac acc aat tat tat ttc gat gtt tcc cat gaa Phe Thr Ser Gly Glu His Thr Asn Tyr Tyr Phe Asp Val Ser His Glu 145 150 155	483
cac ttg gaa gga gcc ctg gac agg ttt gcc cag ttt ttc ctg tgc ccc His Leu Glu Gly Ala Leu Asp Arg Phe Ala Gln Phe Phe Leu Cys Pro 160 165 170	531
ttg ttt gat gca agt tgt aag gac aga gag gtg aac gct gtc gat tca Leu Phe Asp Ala Ser Cys Lys Asp Arg Glu Val Asn Ala Val Asp Ser 175 180 185	579
gag cat gaa aag aat gtg atg aat gat gcc tgg aga ctc ttc cag ctg Glu His Glu Lys Asn Val Met Asn Asp Ala Trp Arg Leu Phe Gln Leu 190 195 200	627
gaa aag gct aca ggg aat ccc aag cac ccc ttc agc aaa ttc ggg aca Glu Lys Ala Thr Gly Asn Pro Lys His Pro Phe Ser Lys Phe Gly Thr 205 210 215 220	675
gga aac aaa tat act cta gag act cga ccc aac caa gaa ggc atc gat Gly Asn Lys Tyr Thr Leu Glu Thr Arg Pro Asn Gln Glu Gly Ile Asp 225 230 235	723
gta agg gaa gaa ctc ttg aaa ttt cac tct acg tat tat tgc tcc aat Val Arg Glu Glu Leu Leu Lys Phe His Ser Thr Tyr Tyr Ser Ser Asn 240 245 250	771
ctg atg gcg att tgt gtt tta ggt cga gaa tct tta gat gac ctg act Leu Met Ala Ile Cys Val Leu Gly Arg Glu Ser Leu Asp Asp Leu Thr 255 260 265	819
aat ctg gtg gtg aag tta ttt tct gaa gta gag aat aaa aat gtc cct Asn Leu Val Val Lys Leu Phe Ser Glu Val Glu Asn Lys Asn Val Pro 270 275 280	867
ttg cct gaa ttt cct gag cac cct ttc caa gaa gaa cat ctt aaa caa Leu Pro Glu Phe Pro Glu His Pro Phe Gln Glu Glu His Leu Lys Gln 285 290 295 300	915

ctt tat aaa ata gta ccc att aag gat att agg aat ctt tat gtg aca Leu Tyr Lys Ile Val Pro Ile Lys Asp Ile Arg Asn Leu Tyr Val Thr 305 310 315	963
ttt ccc ata cca gac ctt caa cag tac tac aaa tcc aat ccc ggt cat Phe Pro Ile Pro Asp Leu Gln Gln Tyr Tyr Lys Ser Asn Pro Gly His 320 325 330	1011
tat ctc ggt cat ctg atc ggg cat gaa ggt cct gga agc ctg ttg tca Tyr Leu Gly His Leu Ile Gly His Glu Gly Pro Gly Ser Leu Leu Ser 335 340 345	1059
gag ctc aag tca aag ggc tgg gta aac acc ctg gtt ggg gga cag aag Glu Leu Lys Ser Lys Gly Trp Val Asn Thr Leu Val Gly Gly Gln Lys 350 355 360	1107
gaa gga gcc cga ggt ttt atg ttt ttt atc att aat gtg gac tta act Glu Gly Ala Arg Gly Phe Met Phe Phe Ile Ile Asn Val Asp Leu Thr 365 370 375 380	1155
gaa gaa ggg tta tta cat gtt gaa gat ata att ttg cac atg ttt caa Glu Glu Gly Leu Leu His Val Glu Asp Ile Ile Leu His Met Phe Gln 385 390 395	1203
tac att cag aag cta cgt gct gaa gga cct caa gaa tgg gtt ttc caa Tyr Ile Gln Lys Leu Arg Ala Glu Gly Pro Gln Glu Trp Val Phe Gln 400 405 410	1251
gag tgc aag gac ttg aac gct gtc gct ttc agg ttt aaa gat aaa gag Glu Cys Lys Asp Leu Asn Ala Val Ala Phe Arg Phe Lys Asp Lys Glu 415 420 425	1299
agg cca cga ggc tac aca tct aag att gca ggg aaa ttg cac tat tat Arg Pro Arg Gly Tyr Thr Ser Lys Ile Ala Gly Lys Leu His Tyr Tyr 430 435 440	1347
ccc cta aat gga gtg ctc aca gct gaa tat tta ctg gaa gaa ttt aga Pro Leu Asn Gly Val Leu Thr Ala Glu Tyr Leu Leu Glu Glu Phe Arg 445 450 455 460	1395
ccc gac ttg ata gac atg gtt ctt gat aaa ctc aga cca gaa aat gtc Pro Asp Leu Ile Asp Met Val Leu Asp Lys Leu Arg Pro Glu Asn Val 465 470 475	1443
cgg gtg gca ata gtt tct aaa tca ttt gaa ggg aaa act gac cgc aca Arg Val Ala Ile Val Ser Lys Ser Phe Glu Gly Lys Thr Asp Arg Thr 480 485 490	1491
gag cag tgg tat gga acc cag tac aag caa gaa gct atc cca gag gac Glu Gln Trp Tyr Gly Thr Gln Tyr Lys Gln Glu Ala Ile Pro Glu Asp 495 500 505	1539
gtc att cag aaa tgg caa aat gct gac ctg aat ggg aaa ttt aaa ctt Val Ile Gln Lys Trp Gln Asn Ala Asp Leu Asn Gly Lys Phe Lys Leu 510 515 520	1587

cca aca aag aat gaa ttc att cct aca aat ttt gag att ttg gca tta	1635
Pro Thr Lys Asn Glu Phe Ile Pro Thr Asn Phe Glu Ile Leu Ala Leu	
525 530 535 540	
gaa aaa gat gca aca cca tac cct gct ctt att aag gat aca gcc atg	1683
Glu Lys Asp Ala Thr Pro Tyr Pro Ala Leu Ile Lys Asp Thr Ala Met	
545 550 555	
agt aag ctg tgg ttc aaa caa gat gat aaa ttt ttc ttg cgg aaa gct	1731
Ser Lys Leu Trp Phe Lys Gln Asp Asp Lys Phe Phe Leu Pro Lys Ala	
560 565 570	
tgt ctc aac ttt gaa ttt ttc agc cgg ttt gct tat gtg gac ccc ttg	1779
Cys Leu Asn Phe Glu Phe Phe Ser Pro Phe Ala Tyr Val Asp Pro Leu	
575 580 585	
cac tgt aac atg gcc tat ttg tac ctt gaa ctc ctc aca gac tca ctc	1827
His Cys Asn Met Ala Tyr Leu Tyr Leu Glu Leu Leu Lys Asp Ser Leu	
590 595 600	
aac gag tat gca tat gca gca gag cta gca ggc ctg agc tat gat ctc	1875
Asn Glu Tyr Ala Tyr Ala Ala Glu Leu Ala Gly Leu Ser Tyr Asp Leu	
605 610 615 620	
caa aac acc atc tat ggg atg tat ctc tca gtg aaa ggt tac aat gac	1923
Gln Asn Thr Ile Tyr Gly Met Tyr Leu Ser Val Lys Gly Tyr Asn Asp	
625 630 635	
aaa cag cca att ttg cta aag aag atc acc gag aaa atg gct act ttt	1971
Lys Gln Pro Ile Leu Leu Lys Lys Ile Thr Glu Lys Met Ala Thr Phe	
640 645 650	
gag att gat aaa aaa aga ttt gaa att atc aaa gag gcg tac atg cga	2019
Glu Ile Asp Lys Lys Arg Phe Glu Ile Ile Lys Glu Ala Tyr Met Arg	
655 660 665	
tct ctt aat aat ttc cgg gct gag cag cct cac cag cac gcc atg tac	2067
Ser Leu Asn Asn Phe Arg Ala Glu Gln Pro His Gln His Ala Met Tyr	
670 675 680	
tac ctc cgt ctg ctg atg act gaa gtg gcc tgg acc aaa gat gag tta	2115
Tyr Leu Arg Leu Leu Met Thr Glu Val Ala Trp Thr Lys Asp Glu Leu	
685 690 695 700	
aaa gaa gcc ctc gat gat gtg acc ctc ccc cgt ctt aag gcc ttc ata	2163
Lys Glu Ala Leu Asp Asp Val Thr Leu Pro Arg Leu Lys Ala Phe Ile	
705 710 715	
cct cag ctg ctg tcc cgg ctg cat att gaa gcc ctt ctc cat ggc aac	2211
Pro Gln Leu Leu Ser Arg Leu His Ile Glu Ala Leu Leu His Gly Asn	
720 725 730	
ata aca aag cag gct gcc tta gga gtt atg cag atg gta gaa gac acc	2259

Ile Thr Lys Gln Ala Ala Leu Gly Val Met Gln Met Val Glu Asp Thr	
735 740 745	
ctt att gag cat gct cac acc aaa cct ctc ctt cca agt cag cta gtc	2307
Leu Ile Glu His Ala His Thr Lys Pro Leu Leu Pro Ser Gln Leu Val	
750 755 760	
cgg tac aga gaa gtt cag ctc ccc gac cga gga tgg ttt gtt tac cag	2355
Arg Tyr Arg Glu Val Gln Leu Pro Asp Arg Gly Trp Phe Val Tyr Gln	
765 770 775 780	
cgg agg aac gaa gtc cac aat aac tgt ggc att gag att tac tac cag	2403
Arg Arg Asn Glu Val His Asn Asn Cys Gly Ile Glu Ile Tyr Tyr Gln	
785 790 795	
aca gac atg cag agc acc tcg gag aac atg ttc ctg gag ctc ttc tgc	2451
Thr Asp Met Gln Ser Thr Ser Glu Asn Met Phe Leu Glu Leu Phe Cys	
800 805 810	
cag att atc tot gag cct tgc ttc aac act ctg cgt acc aag gag cag	2499
Gln Ile Ile Ser Glu Pro Cys Phe Asn Thr Leu Arg Thr Lys Glu Gln	
815 820 825	
ctt ggc tat att gtc ttc agt gga cct cgt cgg gcc aac ggc atc cag	2547
Leu Gly Tyr Ile Val Phe Ser Gly Pro Arg Arg Ala Asn Gly Ile Gln	
830 835 840	
ggc ttg cga ttc atc atc cag tca gaa aaa cca cct cac tac ctg gaa	2595
Gly Leu Arg Phe Ile Ile Gln Ser Glu Lys Pro Pro His Tyr Leu Glu	
845 850 855 860	
agc aga gtg gaa gcc ttc ttg atc acc atg gaa aag gcc ata gag gac	2643
Ser Arg Val Glu Ala Phe Leu Ile Thr Met Glu Lys Ala Ile Glu Asp	
865 870 875	
atg aca gag gag gct ttc caa aaa cac att cag gcg tta gcg att cgc	2691
Met Thr Glu Glu Ala Phe Gln Lys His Ile Gln Ala Leu Ala Ile Arg	
880 885 890	
cga ctc gac aaa cca aag aaa ctc tct gca gag tgc gcg aag tac tgg	2739
Arg Leu Asp Lys Pro Lys Lys Leu Ser Ala Glu Cys Ala Lys Tyr Trp	
895 900 905	
ggg gag atc atc tcc cag cag tac aat tat gac aga gat aac ata gag	2787
Gly Glu Ile Ile Ser Gln Gln Tyr Asn Tyr Asp Arg Asp Asn Ile Glu	
910 915 920	
gtt gca tat tta aag aca ctc agc aag gat gat atc atc aaa ttc tac	2835
Val Ala Tyr Leu Lys Thr Leu Ser Lys Asp Asp Ile Ile Lys Phe Tyr	
925 930 935 940	
aag gaa atg ttg gct gtg gac gca cca agg aga cat aaa gta tcc gtc	2883
Lys Glu Met Leu Ala Val Asp Ala Pro Arg Arg His Lys Val Ser Val	
945 950 955	
cac gtt ctt gcc agg gaa atg gat tct tgt cct gtg gtt gga gag ttc	2931

His Val Leu Ala Arg Glu Met Asp Ser Cys Pro Val Val Gly Glu Phe
960 965 970

ccc tct cag aat gat ata aac ctt tcc gaa gcg cca ccc ttg cca caa 2979
Pro Ser Gln Asn Asp Ile Asn Leu Ser Glu Ala Pro Pro Leu Pro Gln
975 980 985

cct gag gtg att cat aac atg act gaa ttc aag cgc ggc ctg ccg ctg 3027
Pro Glu Val Ile His Asn Met Thr Glu Phe Lys Arg Gly Leu Pro Leu
990 995 1000

ttc ccc ctt gtg aag cca cac att aac ttc atg gcg gca aaa ctc tga 3075
Phe Pro Leu Val Lys Pro His Ile Asn Phe Met Ala Ala Lys Leu *
1005 1010 1015

agaagcagct gcgcccctgt gccttcgagg gccaggaaaag cagtctcagc tttagtagt 3135
ttctggcttg caattagaga gacaaacaga aaagagttat caggcattat tatgtagaat 3195
gttaaaaacc caaagtaata aaattataaa gtcttataga tgtagaatat ttttaaaatc 3255
tcctaaatat tttaatgttt ttctttttat tcctaaaaga aatttcctta tattaactgc 3315
ttaatctgaa gaaagatata tcagtacaat ctttcttccct tatctctgtaa aatagtcact 3375
tgtctgaaaa aaaaataaga gctttttttt cttaaaggct tcagaacact tagaaaggat 3435
taccttttta agacgcgac aagctcagat ctgcttctgt cgaagggttc tgtgaaccag 3495
cagagcatcg cgggtgggcag atagtgacaca aagcgggttc gcgttccttt actagtgaac 3555
ctgctgatta actaaggcat ggttttaatg tttttataaa acttgggtat gttttttaac 3615
cttcttagtc aaatgctaga aaaccagaa tacccaattt acagtgtctag aaatgcagat 3675
taaccttgaa tcaagttcgg aattttctcag gattcctgtg ggttctctct catcgaattc 3735
tgttgacatt totgtttctc gtagttggtc tgctgggttc catcagcaga cacatactgc 3795
tgtacagcgt gtgagacatg ctgtgtgac atcagctgtt gtgactcccc gtaactccta 3855
gggtgaagtt gtgatccgtg tgtgaactaa aacatttgcc ccttttaggga ctcaaaaggc 3915
agcaaataca aagccacctc ctggaggat aaaaaactgt ggcgttctta aacagccagt 3975
ctccgtaaga ctctaaactc cccactgctt ccggtctcat ctgacctaa gtgttatatt 4035
ttgaatatat gaatataaac atacagatga tgactggagt ggacttttaa aaaatatttt 4095
tttcacaaga tactatttta ggtgaaaatg ttactgtaga tttaacagct gttttaaagt 4155
atttgctatt attaaaactt cttcaagaac aagcgtggct atgctccac acacaggcaa 4215
tagtaacaga aagtgtctct gtttgtccac cagctcaggc aaagtacaga atggcggttc 4275
c 4276

<210> 23
<211> 1019
<212> PRT
<213> Rat

<400> 23
Met Arg Asn Gly Leu Val Trp Leu Leu His Pro Ala Leu Pro Ser Thr
1 5 10 15
Leu His Ser Ile Leu Gly Ala Arg Pro Pro Val Lys Arg Leu Cys
20 25 30
Gly Phe Pro Lys Gln Ile Tyr Ser Thr Met Asn Asn Pro Ala Ile Gln
35 40 45
Arg Ile Glu Asp His Ile Val Lys Ser Pro Glu Asp Lys Arg Glu Tyr
50 55 60
Arg Gly Leu Glu Leu Ala Asn Gly Ile Lys Val Leu Leu Ile Ser Asp
65 70 75 80
Pro Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ala Leu Asp Val His Ile Gly Ser
85 90 95
Leu Ser Asp Pro Pro Asn Ile Pro Gly Leu Ser His Phe Cys Glu His

Thr Pro Tyr Pro Ala Leu Ile Lys Asp Thr Ala Met Ser Lys Leu Trp
 545 550 555 560
 Phe Lys Gln Asp Asp Lys Phe Phe Leu Pro Lys Ala Cys Leu Asn Phe
 565 570 575
 Glu Phe Phe Ser Pro Phe Ala Tyr Val Asp Pro Leu His Cys Asn Met
 580 585 590
 Ala Tyr Leu Tyr Leu Glu Leu Lys Asp Ser Leu Asn Glu Tyr Ala
 595 600 605
 Tyr Ala Ala Glu Leu Ala Gly Leu Ser Tyr Asp Leu Gln Asn Thr Ile
 610 615 620
 Tyr Gly Met Tyr Leu Ser Val Lys Gly Tyr Asn Asp Lys Gln Pro Ile
 625 630 635 640
 Leu Leu Lys Lys Ile Thr Gln Lys Met Ala Thr Phe Glu Ile Asp Lys
 645 650 655
 Lys Arg Phe Glu Ile Ile Lys Glu Ala Tyr Met Arg Ser Leu Asn Asn
 660 665 670
 Phe Arg Ala Glu Gln Pro His Gln His Ala Met Tyr Tyr Leu Arg Leu
 675 680 685
 Leu Met Thr Glu Val Ala Trp Thr Lys Asp Glu Leu Lys Glu Ala Leu
 690 695 700
 Asp Asp Val Thr Leu Pro Arg Leu Lys Ala Phe Ile Pro Gln Leu Leu
 705 710 715 720
 Ser Arg Leu His Ile Glu Ala Leu Leu His Gly Asn Ile Thr Lys Gln
 725 730 735
 Ala Ala Leu Gly Val Met Gln Met Val Glu Asp Thr Leu Ile Glu His
 740 745 750
 Ala His Thr Lys Pro Leu Leu Pro Ser Gln Leu Val Arg Tyr Arg Glu
 755 760 765
 Val Gln Leu Pro Asp Arg Gly Trp Phe Val Tyr Gln Arg Arg Asn Glu
 770 775 780
 Val His Asn Asn Cys Gly Ile Glu Ile Tyr Tyr Gln Thr Asp Met Gln
 785 790 795 800
 Ser Thr Ser Glu Asn Met Phe Leu Glu Leu Phe Cys Gln Ile Ile Ser
 805 810 815
 Glu Pro Cys Phe Asn Thr Leu Arg Thr Lys Glu Gln Leu Gly Tyr Ile
 820 825 830
 Val Phe Ser Gly Pro Arg Arg Ala Asn Gly Ile Gln Gly Leu Arg Phe
 835 840 845
 Ile Ile Gln Ser Glu Lys Pro Pro His Tyr Leu Glu Ser Arg Val Glu
 850 855 860
 Ala Phe Leu Ile Thr Met Glu Lys Ala Ile Glu Asp Met Thr Glu Glu
 865 870 875 880
 Ala Phe Gln Lys His Ile Gln Ala Leu Ala Ile Arg Arg Leu Asp Lys
 885 890 895
 Pro Lys Lys Leu Ser Ala Glu Cys Ala Lys Tyr Trp Gly Glu Ile Ile
 900 905 910
 Ser Gln Gln Tyr Asn Tyr Asp Arg Asp Asn Ile Glu Val Ala Tyr Leu
 915 920 925
 Lys Thr Leu Ser Lys Asp Asp Ile Ile Lys Phe Tyr Lys Glu Met Leu
 930 935 940
 Ala Val Asp Ala Pro Arg Arg His Lys Val Ser Val His Val Leu Ala
 945 950 955 960
 Arg Glu Met Asp Ser Cys Pro Val Val Gly Glu Phe Pro Ser Gln Asn
 965 970 975
 Asp Ile Asn Leu Ser Glu Ala Pro Pro Leu Pro Gln Pro Glu Val Ile

980 985 990
 His Asn Met Thr Glu Phe Lys Arg Gly Leu Pro Leu Phe Pro Leu Val
 995 1000 1005
 Lys Pro His Ile Asn Phe Met Ala Ala Lys Leu
 1010 1015

【図面の簡単な説明】

【図1】

コンジェニック種Niddm1a、niddm1b、およびNiddm1iでのラットクロモソーム1の遠位部分の遺伝子マップである。

【図2】

Niddm1コンジェニックおよびF344ラットの腹膜内グルコース耐性試験を図示したグラフである。

【図3】

F344、GK、Niddm1b、およびNiddm1iラットでのインスリンによって刺激される合成の結果として、脂質内へのグルコースの取り込みを図示したグラフである。

【図4】

GK、F344およびNiddm1ラットでのインスリンRNAの定量的解析を示したグラフである。

【図5】

コンジェニックラット種Niddm1b、Niddm1c、Niddm1fおよびNiddm1eラットでの、ラットクロモソーム1の部分の遺伝的マップである。

【図6】

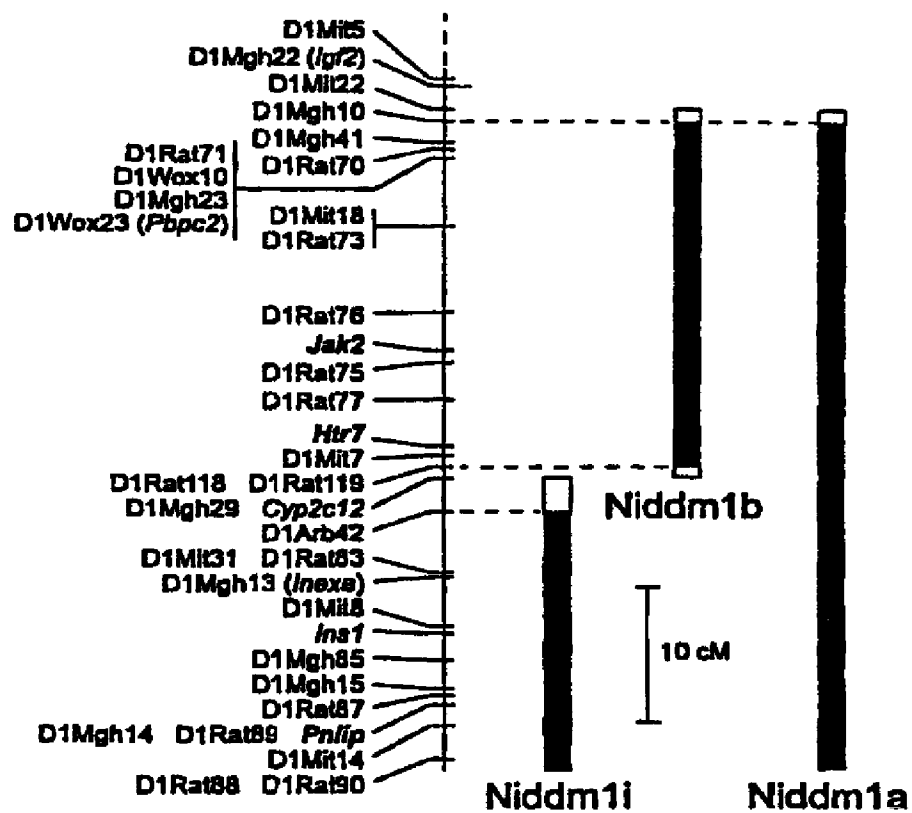
精巣上体脂肪から単離した脂肪細胞における脂質生成を図示したグラフである。

【図7】

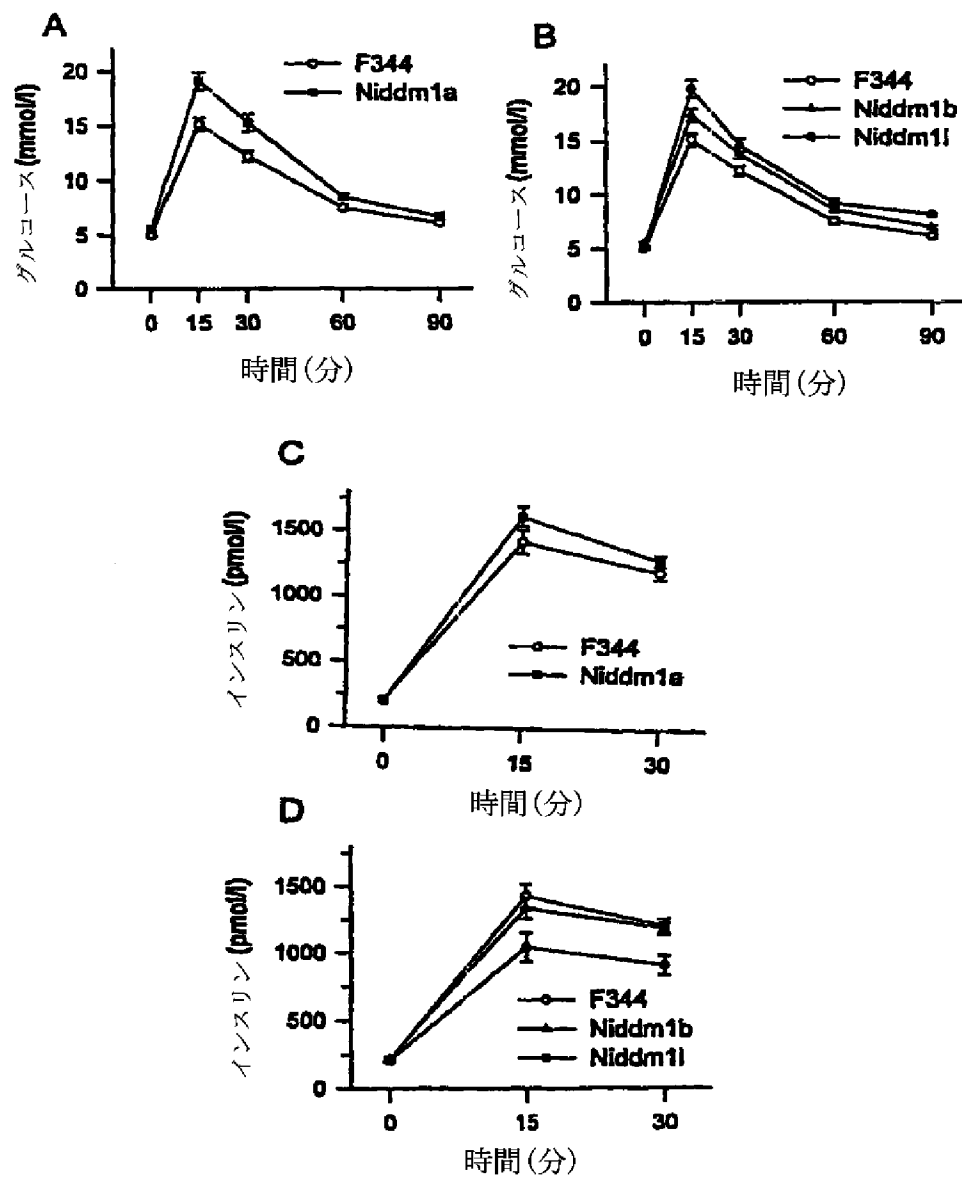
ラットインスリン分解酵素（IDE）をコードしている遺伝子の翻訳部分の概略図である。

【図8】

もともとのCOS-1細胞内での、野生型IDEおよびIDE変異体A890V（すなわち、アミノ酸890の位置でアラニンの代わりにバリンであるもの）、H18R（すなわち、アミノ酸18の位置でヒスチジンの代わりにアルギニンであるもの）、およびA890V+H18Rのインスリン分解活性を図示しているグラフである。

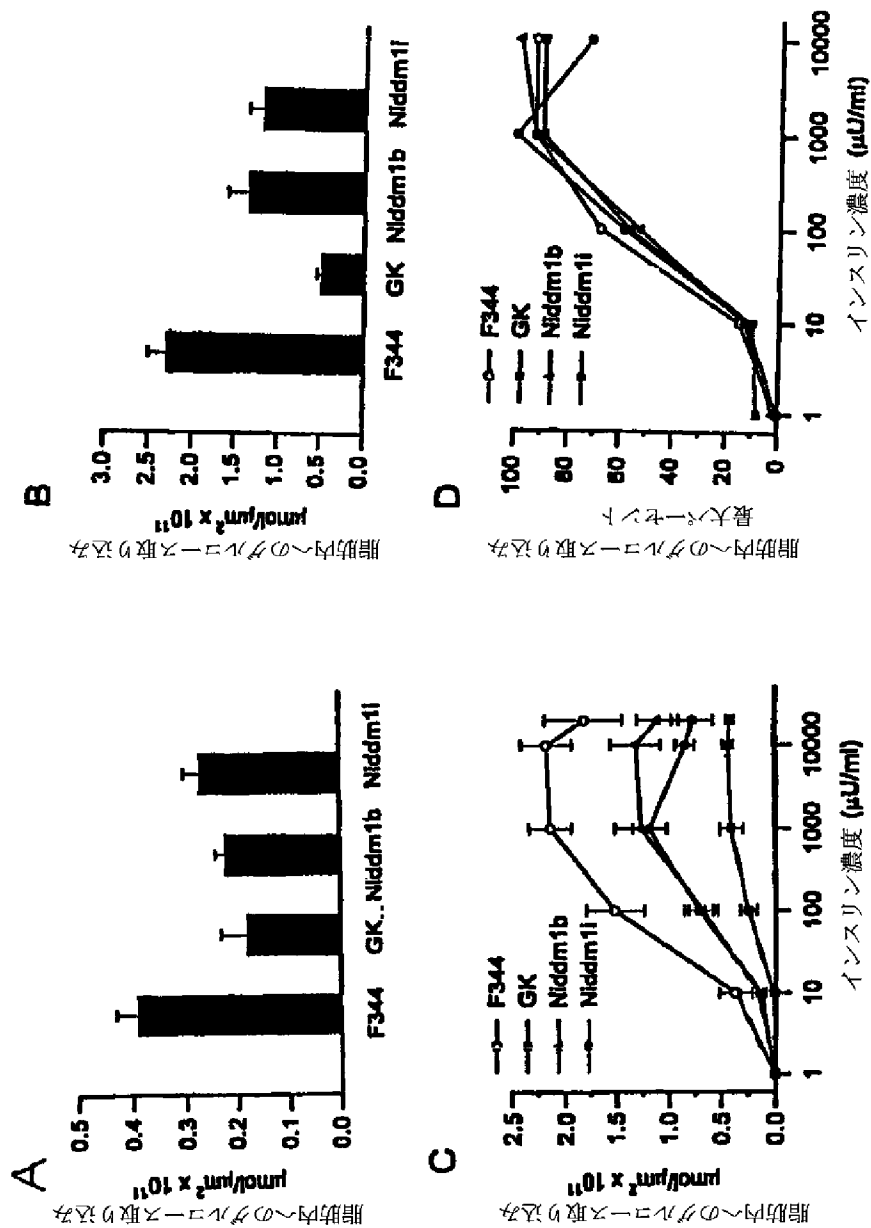


【図2】

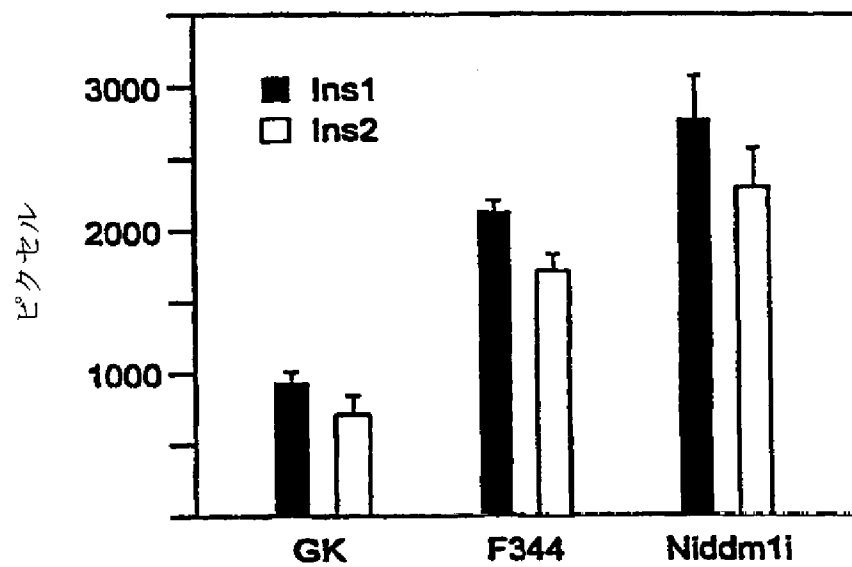


【図 3】

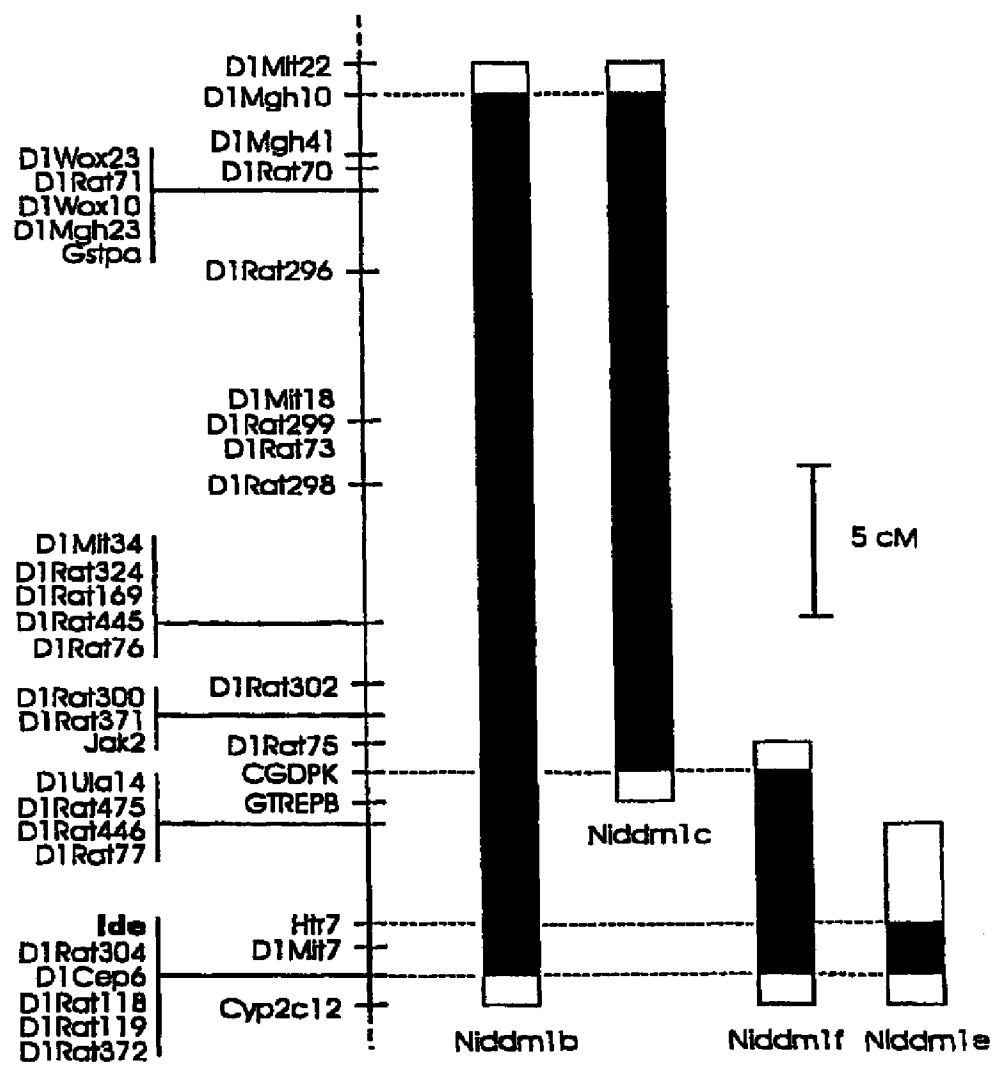
3



【図4】



【図 5】



【図6】

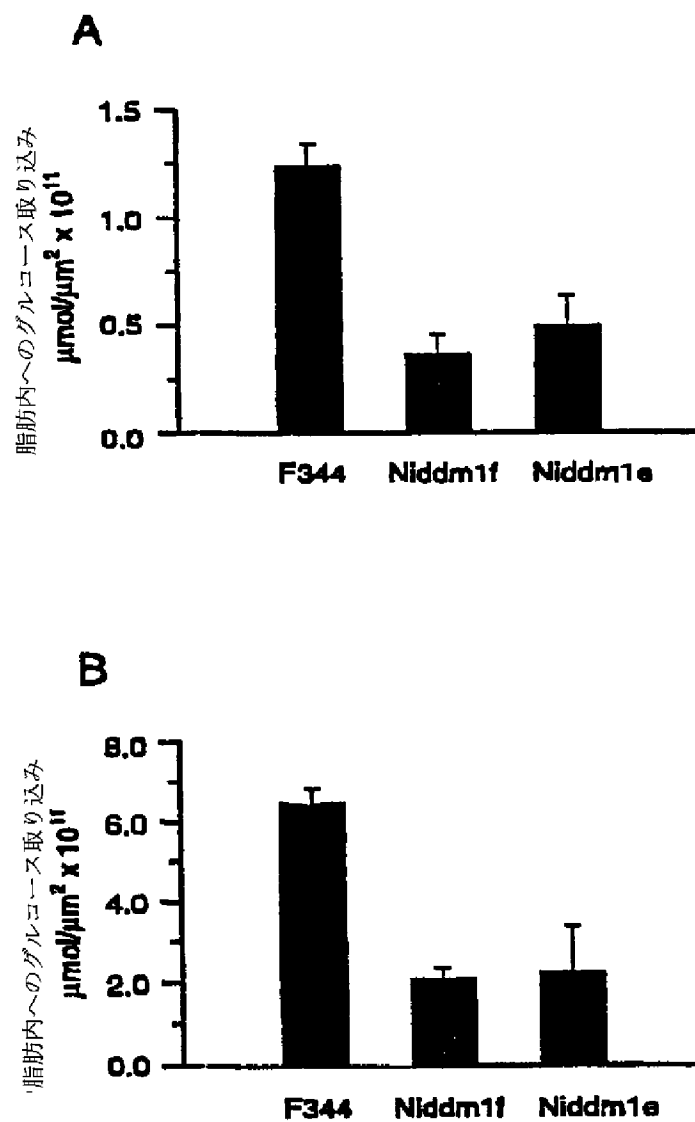
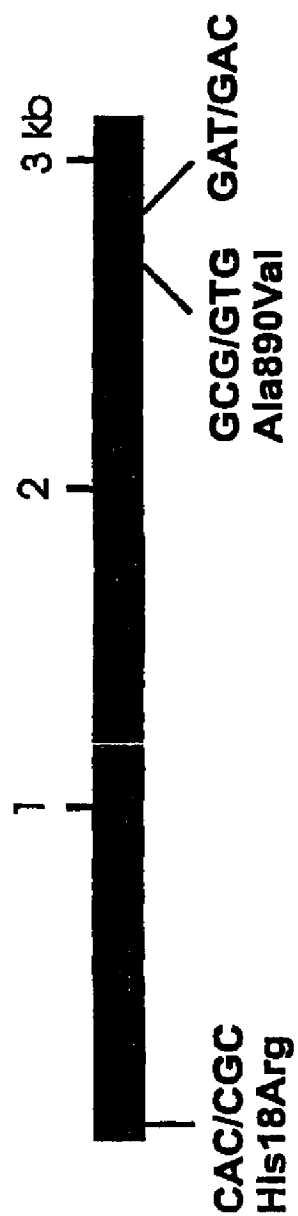
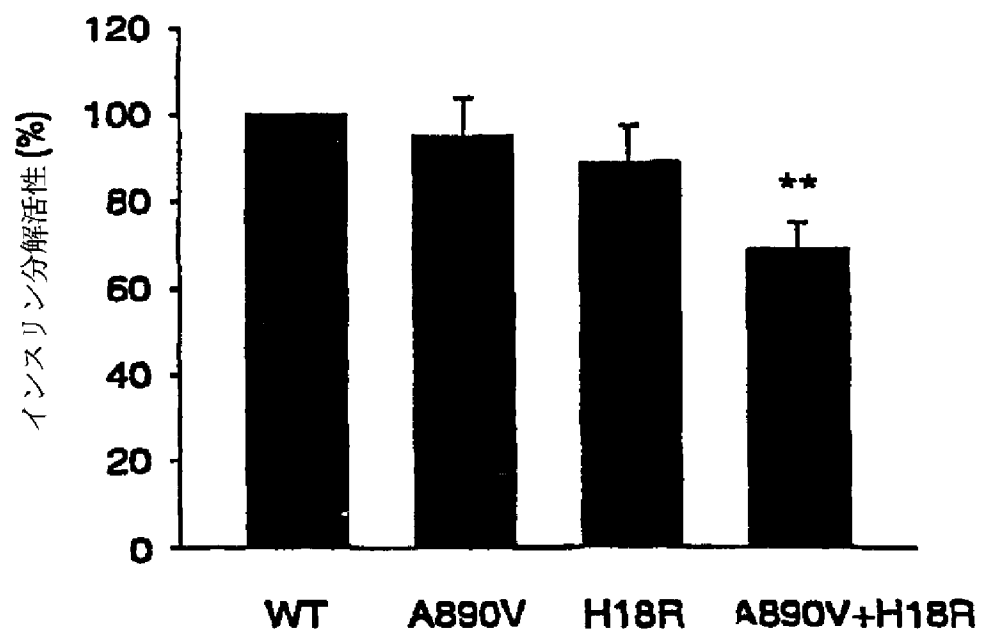


图 7



【図8】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 00/02168

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: C07K 14/62, A61K 38/28, C12N 15/00, G01N 33/68
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C07K, A61K, C12N, G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SE,DK,FI,NO classes as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5614396 A (ALLAN BRADLEY ET AL), 25 March 1997 (25.03.97), column 27, line 20	1-10
A	--	1-33
P,X	Human Molecular Genetics, Volume 9, No 14, 2000, Hossein Fakhrai-Rad et al, "Insulin-degrading enzyme identified as a candidate diabetes susceptibility gene in GK rats", page 2149 - page 2158, Results	1-45
X	WO 9935169 A3 (DUCKWORTH, WILLIAM), 15 July 1999 (15.07.99), page 50; page 51	34-41
	--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 April 2001

Date of mailing of the international search report

26 April 2001

Name and mailing address of the ISA

Swedish Patent Office
 Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM
 Facsimile No. +46 8 666 02 86

Authorized officer

Yvonne Siösteen/BS
 Telephone No. +46 8 782 25 00

Form PCT/ISA 210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 00/02168

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Science, Volume 242, 1988, Joseph A. Affholter et al, "Human Insulin-Degrading Enzyme Shares Structural and Functional Homologies with E. coli Protease III", page 1415 - page 1418, Acc. A40119, Pirl, suhuin Database, 95% sequence Identity with seq 23 --	34-41
X	Proc. Natl. Acad. Sci., Volume 89, 1992, Andrew B. Becker et al, "An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases", page 3835 - page 3839, Database Pirl. suhuin. Acc. A36115, 95% sequence Identity with seq23 (substitution a.a.18) --	34-41
X	FEBS letters, Volume 317, No 3, 1993, Hans Baumeister et al, "Molecular cloning and characterization of tissue-specific transcript", page 250 - page 254, Database Pirl.529509, 100% sequence Identity with seq23 --	34-41
X	Endocrinology, Volume 132, No 2, 1993, Wen-Liang Kuo et al, "Insulin-Degrading Enzyme Is Differentially Expressed and Developmentally Regulated in Various Rat Tissues", page 604 - page 611, Acc.I 53265, Pirl.529509, 100% sequence Identity with seq23 --	34-41
X	FEBS Letters, Volume 401, 1997, Rajiv L. et al, "Genetically engineered mice as animal models for NIDDM", page 99 - page 103, figure 1 --	43-45
Y	WO 9119796 A1 (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE), 26 December 1991 (26.12.91), page 72 - page 79 --	1-33
Y	US 5795726 A (M. ALEXANRA GLUCKSMANN), 18 August 1998 (18.08.98), claims --	1-33

Form PCT ISA 210 (continuation of second sheet) (July 1995)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/SE 00/02168

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 9823145 A1 (GENE/NETWORKS INCORPORATED), 4 June 1998 (04.06.98), page 14, line 10 - line 25</p> <p>-- -----</p>	1-33

Form PCT ISA 210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/SE00/02168**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **42**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see next sheet
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where novelty of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-33**Invention 2: claims 34-41, 43-45**

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

Box I.2

Due to the very large number of variable position in the aminoacid chain, a full evaluation of the relevance of the state of the art literature has not been made. The search has therefore essentially been restricted to positions and aminoacids supported by the examples.

Box II

Present claims 1-7 relate to an extremely large number of possible variations. The use of the parameter "centimorgan" is unclear referring to the recombination containing genetical material. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the variations claimed.

In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible.

Consequently the search has been carried out for those parts of the claims, which appear to be supported, and disclosed, namely those parts related to a non-human congenic animal and Niddm.

The first invention relates to non-human congenic animals comprising genetic material of a donor. This genetic material consists of the type II diabetes associated phenotype (Niddm). The second invention relates to a polypeptide with the sequences SEQ ID No23, SEQ ID No22 and a transgenic non-human animal whose genome comprise an insulin-degrading polypeptide transgene.

Unity of invention exists only when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding „ Special technical features „ -i. e. features that define a contribution which each of the inventions make over the prior art. (See Annex B to Administrative Instructions and Rule 13.1). No such unifying relationship has been found.

Consequently, The claims consists of the following two inventions:

- 1) A non human congenic animal and method there of, according to claims 1-33.
- 2) A polypeptide and a transgenic non-human animal according to claims 34-41, 43-45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

02/04/01

International application No.

PCT/SE 00/02168

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US	5614396	A	25/03/97	AU	654284 B	03/11/94
				AU	8182391 A	07/01/92
				CA	2084774 A	13/12/91
				EP	0535144 A	07/04/93
				WO	9119796 A	26/12/91

WO	9935169	A3	15/07/99	AU	2313899 A	26/07/99
				EP	1045860 A	25/10/00

WO	9119796	A1	26/12/91	AU	654284 B	03/11/94
				AU	8182391 A	07/01/92
				CA	2084774 A	13/12/91
				EP	0535144 A	07/04/93
				US	5614396 A	25/03/97

US	5795726	A	18/08/98	AU	5252698 A	03/06/98
				US	6143491 A	07/11/00
				WO	9821239 A	22/05/98
				US	5800998 A	01/09/98

WO	9823145	A1	04/06/98	AU	5451898 A	22/06/98

Form PCT/ISA 210 (patent family annex) (July 1998)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 5/00	E

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, F I, FR, GB, GR, I E, I T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, B J, C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P(G H, G M, K E, L S, M W, M Z, S D, S L, S Z, T Z, U G, Z W), E A(A M, A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M), A E, A G, A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, B Z, C A, C H, C N, C R, C U, C Z, D E, D K, D M, D Z, E E, E S, F I, G B, G D, G E, G H, G M, H R, H U, I D, I L, I N, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L V, M A, M D, M G, M K, M N, M W, M X, M Z, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, T Z, U A, U G, U S, U Z, V N, Y U, Z A, Z W

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA20 BA14 CA04
DA02 EA04 GA14 HA01
4B050 CC04 DD11 LL03 LL10
4B065 AA90X AA91Y AC14 BA03
CA33 CA44 CA46